

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
19. September 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/072848 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 15/82**,  
15/54, 9/10

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/02492

(22) Internationales Anmeldedatum:  
7. März 2002 (07.03.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 11 676.4 9. März 2001 (09.03.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **SUNGENE GMBH & CO. KGAA** [DE/DE]; 06468  
Gatersleben (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BADUR, Ralf**  
[DE/DE]; Teodor-Storm-Str. B, 67117 Limburgerhof  
(DE). **GEIGER, Michael** [DE/DE]; Neuer Weg 15, 06484  
Quedlinburg (DE).

(74) Anwalt: **DOERPER, Thomas**; c/o BASF Aktiengesellschaft,  
67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: INCREASE IN THE VITAMIN E CONTENT IN ORGANISMS DUE TO AN INCREASE IN THE TYROSINE AMINOTRANSFERASE ACTIVITY

(54) Bezeichnung: ERHÖHUNG DES VITAMIN-E-GEHALTS IN ORGANISMEN DURCH ERHÖHUNG DER TYROSINAMINOTRANSFERASE-AKTIVITÄT

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing vitamin E by cultivating organisms, especially plants, which have an increased tyrosine aminotransferase activity in relation to the wild type. The invention also relates to the genetically modified organisms, especially plants themselves.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung von Organismen, insbesondere Pflanzen, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität aufweisen, sowie die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Pflanzen selbst.



**WO 02/072848 A2**

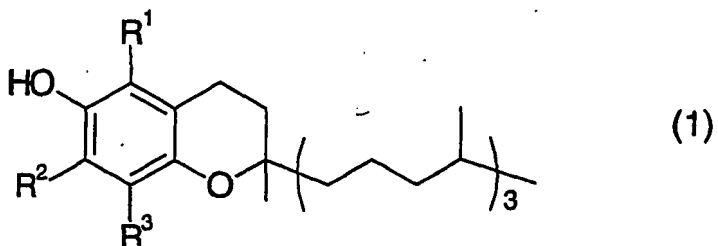
Erhöhung des Vitamin-E-Gehalts in Organismen durch Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität

## 5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung von Organismen, insbesondere Pflanzen die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Tyrosinamino-  
 10 transferase-Aktivität aufweisen, sowie die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Pflanzen selbst.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia  
 15 of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die Gruppe der Tocopherole (1a-d) weist eine gesättigte Seitenkette auf, die Gruppe der Tocotrienole (2a-d) eine ungesättigte Seitenkette:

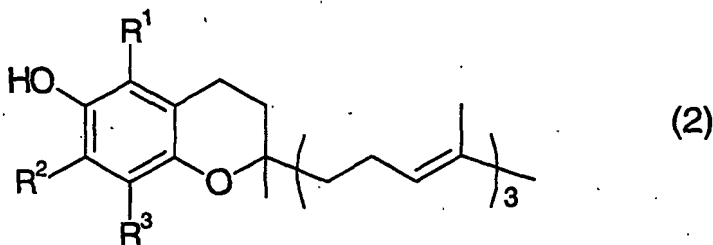
20



25

- 1a,  $\alpha$ -Tocopherol:  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 1b,  $\beta$ -Tocopherol:  $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$   
 1c,  $\gamma$ -Tocopherol:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 30 1d,  $\delta$ -Tocopherol:  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$

35



- 2a,  $\alpha$ -Tocotrienol:  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 40 2b,  $\beta$ -Tocotrienol:  $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$   
 2c,  $\gamma$ -Tocotrienol:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 2d,  $\delta$ -Tocotrienol:  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$

In der vorliegenden Erfindung werden unter Vitamin E alle vor-  
 45 stehend erwähnten Tocopherole und Tocotrienole mit Vitamin-E-Aktivität verstanden.

Diese Verbindungen mit Vitamin-E-Aktivität sind wichtige natürliche fett-lösliche Antioxidantien. Ein Mangel an Vitamin E führt bei Menschen und Tieren zu pathophysiologischen Situationen. Vitamin E-Verbindungen haben daher einen hohen wirtschaftlichen Wert als Zusatzstoffe im Food- und Feed-Bereich, in pharmazeutischen Formulierungen und in kosmetischen Anwendungen.

Ein wirtschaftliches Verfahren zur Herstellung von Vitamin E-Verbindungen sowie Nahrungs- und Futtermittel mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt sind daher von großer Bedeutung.

Besonders wirtschaftliche Verfahren sind biotechnologische Verfahren unter Ausnutzung natürlicher oder durch genetische Veränderung optimierter Vitamin-E-produzierender Organismen.

Abbildung 62 zeigt ein Biosyntheschema von  $\alpha$ -Tocopherol in höheren Pflanzen.

In höheren Pflanzen wird Tyrosin ausgehend von Chorismat über Prephenat und Arogenat gebildet. Die aromatische Aminosäure Tyrosin wird durch das Enzym Tyrosinaminotransferase in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird.

Die Homogentisinsäure wird anschließend an Phytylpyrophosphat (PPP) bzw. Geranylgeranylpyrophosphat gebunden, um die Vorläufer von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocotrienol, das 2-Methyl-6-phytylhydrochinol bzw. das 2-Methyl-6-geranylgeranylhydrochinol zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methylgruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung  $\gamma$ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung  $\alpha$ -Tocopherol.

Es sind Versuche bekannt, in transgenen Organismen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene eine Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol- bzw. Tocotrienolgehaltes zu erreichen.

WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatioxygenase (HPPD).

WO 99/04622 bzw. D. DellaPenna et al., Science 1998, 282, 2098-2100 beschreiben Gensequenzen codierend für eine  $\gamma$ -Tocopherolmethyltransferase aus Synechocystis PCC6803 und Arabidopsis thaliana und deren Einbau in transgene Pflanzen, die einen modifizierten Vitamin E-Gehalt aufweisen.

WO 99/23231 zeigt, daß die Expression einer Geranylgeranyl-Reductase in transgenen Pflanzen eine gesteigerte Tocopherolbiosynthese zur Folge hat.

5 WO 00/08169 beschreibt Gensequenzen codierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase und deren Einbau in transgene Pflanzen, die einen modifizierten Vitamin E-Gehalt aufweisen.

10 WO 00/68393 und WO 00/63391 beschreiben Gensequenzen codierend eine Phytyl/Prenyl-Transferase und deren Einbau in transgene Pflanzen, die einen modifizierten Vitamin E-Gehalt aufweisen.

In WO 00/61771 wird postuliert, daß die Kombination eines Gens  
15 aus dem Sterol-Stoffwechsel in Kombination mit einem Gen aus dem Tocopherolstoffwechsel zu einer Erhöhung des Tocopherolgehalts in transgenen Pflanzen führen kann.

In einer von A. Lopoukhina verfassten Doktorarbeit (*Characteri-*  
20 *zation of coronatine regulated genes from Arabidopsis thaliana*, Doktorarbeit an der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, 1999) und in einem Posterbeitrag von H. Holländer-Czytko et al. auf der Botanikertagung 2000 in Jena vom 17-22.9.2000 werden durch das Phytotoxin Coronatin induzier-  
25 bare Gene aus *Arabidopsis thaliana* offenbart. Bei einem dieser Gene weist die abgeleitete Aminosäuresequenz eine Homologie von ca. 35 % mit bekannten Tyrosinaminotransferasen auf. Durch heterologe Expression des putativen Tyrosinaminotransferase-Gens in *E.coli* konnte eine geringe Enzymaktivität einer Tyrosinamino-  
30 transferase nachgewiesen werden. Es wird offenbart, daß die Behandlung von Pflanzen mit Coronatin und die Verwundung von Pflanzen zu einer Akkumulation der putativen Tyrosinaminotransferase-spezifischen mRNA, der putativen Tyrosinaminotransferase und der meßbaren Enzymaktivität führt. Ferner wird  
35 auf Seite 72 f. der Doktorarbeit offenbart, daß es bekannt sei, daß die Verwundung von Pflanzen zu einer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt, die durch antioxidative Verbindungen wie Tocopherol, Carotinoide oder Rosmarinsäure abgefangen werden.

40 Alle diese Methoden, bis auf den zuletzt erwähnten Stand der Technik, liefern zwar genetisch veränderte Organismen, insbesondere Pflanzen, die in der Regel einen modifizierten Gehalt an Vitamin E aufweisen, weisen jedoch den Nachteil auf, daß die Höhe des Gehalts an Vitamin E in den im Stand der Technik  
45 bekannten genetisch veränderten Organismen noch nicht zufriedenstellend ist.



Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung von Organismen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere transgene Organismen, die Vitamin E herstellen, zur Verfügung zu stellen, 5 die optimierte Eigenschaften, wie beispielsweise einen höheren Gehalt an Vitamin E aufweisen und den geschilderten Nachteil des Standes der Technik nicht aufweisen.

Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Vitamin E gefunden, indem man Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wild- 10 typ eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität aufweisen.

Unter Tyrosinaminotransferase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Tyrosinaminotransferase verstanden.

15

Unter einer Tyrosinaminotransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Tyrosin in 4-Hydroxyphenylpyruvat umzuwandeln.

20 Dementsprechend wird unter Tyrosinaminotransferase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Tyrosinaminotransferase umgesetzte Menge Tyrosin bzw. gebildete Menge 4-Hydroxyphenylpyruvat verstanden..

25 Bei einer erhöhten Tyrosinaminotransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Tyrosinaminotransferase die umgesetzte Menge Tyrosin bzw. die gebildete Menge 4-Hydroxyphenylpyruvat erhöht.

30

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter 35 mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Tyrosinaminotransferase-Aktivität des Wildtyps.

Unter einem Wildtyp wird der entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangsorganismus verstanden. Vorzugsweise und insbesondere in Fällen in denen der Organismus oder der Wildtyp nicht 40 eindeutig zuordenbar ist, wird unter Wildtyp für die Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Homogentisat-Phenylpyruvat-Transferrase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, die Erhöhung 45 der nachstehend beschriebenen 2-Me-

thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Tocopherolcyclase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität, die Reduzierung der nachstehend beschriebenen Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität, die Reduzierung der nachstehend beschriebenen Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität und die Reduzierung der nachstehend beschriebenen Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität, sowie für die Erhöhung des Gehalts an Vitamin E ein Referenzorganismus verstanden. Dieser Referenzorganismus ist vorzugsweise *Brassica napus cv Westar*.

Die Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung des Tyrosinaminotransferase-Gens durch Phytotoxine wie beispielsweise Coronatin oder durch Einbringen von Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus, insbesondere Pflanzen eigenen endogenen Tyrosinaminotransferasen verstanden. Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Tyrosinaminotransferasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte oder vorzugsweise erhöhte Expressionsrate mindestens eines endogenen Tyrosinaminotransferase Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression mindestens einer endogenen Tyrosinaminotransferase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression mindestens eines endogenen Tyrosinaminotransferase Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulatorprotein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase.

5

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase durch Einbringen von Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase in den Organismus.

10

Dazu kann prinzipiell jedes Tyrosinaminotransferase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine Tyrosinaminotransferase codiert verwendet werden. Bei genomischen Tyrosinaminotransferase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Tyrosinaminotransferase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

20

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

Beispiele für Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinamino-

25 transferase bzw. Beispiele für Tyrosinaminotransferasen sind

die sechs putativen Tyrosinaminotransferasen TAT I bis TAT VI aus *Arabidopsis thaliana* TATI: CAA23026 (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 5, Protein: SEQ. ID. NO. 6), TAT II: CAA23025, TAT III: AAD23027  
30 (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 7, Protein: SEQ. ID. NO. 8), TAT IV: CAA16881, TAT V: AAD21706 (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 9, Protein: SEQ. ID. NO. 10), TAT VI: (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 11, Protein: SEQ. ID. NO. 12)

35 die Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 1, Protein: SEQ. ID. NO. 2),

eine Variante der Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 3, Protein: SEQ. ID. NO. 4),

40

die humane Tyrosinaminotransferase (Accession No. XP\_008081),

45 die Tyrosinaminotransferase aus *Tryposoma rangeli* (Accession No. AF165323\_1),

die Tyrosinaminotransferase aus *Tryposoma cruzi* (Accession No. AI 622965) oder

die Tyrosinaminotransferase aus *Rhizobium meliloti* (Accession 5 No. L05065).

Bevorzugt verwendet man Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion  
10 von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 33 %, bevorzugter mindestens 35 %, bevorzugter mindestens 50%, noch bevorzugter mindestens 70 %, am bevorzugtesten mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische  
15 Eigenschaft einer Tyrosinaminotransferase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 2 stellt die Aminosäuresequenz der Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* dar.

20 Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, bei-  
25 spielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini  
30 des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere  
35 Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der  
40 Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a micro-computer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

45

Multiple alignment parameter:

Gap penalty

10

8

Gap length penalty	10
Pairwise alignment parameter:	
K-tuple	1
Gap penalty	3
5 Window	5
Diagonals saved	5

- Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist,
- 10 wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.
- 15 Die bekannten Tyrosinaminotransferasen weisen mit der SEQ. ID. NO. 2 (Tyrosinaminotransferasen aus *Rattus norvegicus*) nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz folgende Identität [%] der Aminosäuresequenzen auf:

20 CAA23026 (TAT I)	26,8 %
CAA23025 (TAT II)	22,3 %
AAD23027 (TAT III)	28,3 %
CAA16881 (TAT IV)	29,8 %
AAD21706 (TAT V)	30,0 %
25 TAT VI K19.P17.14	33,3 %
AF165323_1 ( <i>Tryposoma rangeli</i> )	33,3 %
XP_008081 (human)	91,6 %

- In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren
- 30 in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* SEQ. ID. NO. 2 oder die Aminosäuresequenz der humanen Tyrosinaminotransferase (Accession No. XP\_008081).

- 35 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend
- 40 der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in einer Pflanze exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 stellt die cDNA der Tyrosinamino-  
10 transferase aus *Rattus norvegicus* (Accession No. NM\_012668) dar.

- In einer bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe  
15 Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, Tocopherolcyclase-Aktivität und  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität aufweisen.

20

Unter Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase verstanden.

- Unter einer Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase wird ein Protein  
25 verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Hydroxyphenylpyruvat in Homogentisat umzuwandeln.

- Dementsprechend wird unter Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase umgesetzte Menge Hydroxyphenylpyruvat bzw.  
30 gebildete Menge Homogentisat verstanden.

- Bei einer erhöhten Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer  
35 bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase die umgesetzte Menge Hydroxyphenylpyruvat bzw. die gebildete Menge Homogentisat erhöht.

- Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens  
40 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität des Wildtyps.

45

## 10

Unter Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Homogentisat-Phytyltransferase verstanden.

Unter einer Homogentisat-Phytyltransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Homogentisat und Phytilypyrophosphat in 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Homogentisat-Phytyltransferase umgesetzte Menge Homogentisat oder Phytilypyrophosphat bzw. gebildete Menge 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol verstanden.

Bei einer erhöhten Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Homogentisat-Phytyltransferase die umgesetzte Menge Homogentisat oder Phytilypyrophosphat bzw. die gebildete Menge 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität des Wildtyps.

Unter Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase verstanden.

Unter einer Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat in Phytilypyrophosphat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase umgesetzte Menge Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat bzw. gebildete Menge Phytilypyrophosphat verstanden.

Bei einer erhöhten Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase die umgesetzte Menge Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat bzw. die gebildete Menge Phytilypyrophosphat erhöht.

## 11

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch  
5 bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität des Wildtyps.

Unter 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität  
10 wird die Enzymaktivität einer 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase verstanden.

Unter einer 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  
15 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol in 2,3-Dimethyl-6-Phytylhydrochinol umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität die in einer  
20 bestimmten Zeit durch das Protein 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase umgesetzte Menge 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol bzw. gebildete Menge 2,3-Dimethyl-6-Phytylhydrochinol verstanden.

Bei einer erhöhten 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase die umgesetzte Menge  
25 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol bzw. die gebildete Menge 2,3-Dimethyl-6-Phytylhydrochinol erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität mindestens  
35 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität des Wildtyps.

40 Unter Tocopherolcyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Tocopherolcyclase verstanden.

Unter einer Tocopherolcyclase wird ein Protein verstanden, das  
45 die enzymatische Aktivität aufweist, 2,3-Dimethyl-6-Phytylhydrochinol in  $\gamma$ -Tocopherol umzuwandeln.



## 12

Dementsprechend wird unter Tocopherolcyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Tocopherolcyclase umgesetzte Menge 2,3-Dimethyl-6-Phytylhydrochinol bzw. gebildete Menge  $\gamma$ -Tocopherol verstanden.

5

Bei einer erhöhten Tocopherolcyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Tocopherolcyclase die umgesetzte Menge 2,3-Dimethyl-6-Phytylhydrochinol bzw. die gebildete Menge  $\gamma$ -Tocopherol erhöht.

10

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Tocopherolcyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Tocopherolcyclase-Aktivität des Wildtyps.

15

Unter  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase verstanden.

20

Unter einer  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\gamma$ -Tocopherol in  $\alpha$ -Tocopherol umzuwandeln.

25

Dementsprechend wird unter  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase umgesetzte Menge  $\gamma$ -Tocopherol bzw. gebildete Menge  $\alpha$ -Tocopherol verstanden.

30

Bei einer erhöhten  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase die umgesetzte Menge  $\gamma$ -Tocopherol bzw. die gebildete Menge  $\alpha$ -Tocopherol erhöht.

35

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität des Wildtyps.

40

Die Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, 2-Me-

45

thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, Tocopherolcyclase-Aktivität und  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität kann unabhängig voneinander durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmecha-

5 nismen auf Expressions- und Protein-ebene oder durch Erhöhung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäuren, also der Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyl-

10 transferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase gegenüber dem Wildtyp.

15

mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidore-

20 duktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase

25 Die Erhöhung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäure gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung der entsprechenden Gene durch Aktivatoren, also durch Induzierung des Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gens, Homogentisat-Phytyltransferase-Gens, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Gens, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Gens, Tocopherolcyclase-Gens oder  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Genkopien der entsprechenden Nukleinsäuren, also durch Einbringen mindestens

35 einer der Nukleinsäuren, ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase in den Organismus.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend

45 eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Homogentisat-Phytyltransferase, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Tocopherolcyclase

oder  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus eigenen, insbesondere der Pflanzen eigenen, endogenen Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenasen, Homogentisat-Phytyltransferasen, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktasen, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferasen, Tocopherolcyclasen oder  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferasen verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Homogentisat-Phytyltransferase, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Tocopherolcyclase oder  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des entsprechenden Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Homogentisat-Phytyltransferase, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Tocopherolcyclase oder  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

Desweiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression endogener Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-, Homogentisat-Phytyltransferase-, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-, Tocopherolcyclase- oder  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gene dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, im folgenden auch HPPD genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure codierend eine HPPD in den Organismus.

## 15

Dazu kann prinzipiell jedes HPPD-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine HPPD codiert, verwendet werden.

Bei genomischen HPPD-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen

- 5 Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende HPPD zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

10

Beispiele für HPPD-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine HPPD aus *Arabidopsis thaliana* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 13, Protein: Seq. ID. No. 14) oder eine HPPD aus Gerste (WO 99/04021).

- 15 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres HPPD-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine HPPD oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine HPPD auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 14 oder eine von dieser Se-

- 25 quenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14, und die die enzymatische Eigenschaft einer HPPD aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 14 stellt die Aminosäuresequenz der HPPD aus *Arabidopsis thaliana* dar.

- 35 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz
- 40 eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

Weitere Beispiele für HPPD und HPPD-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder

- 45 der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 14 leicht auffinden.

## 16

Die HPPD aus Gerste weist beispielsweise mit der HPPD aus *Arabidopsis thaliana* (Seq. ID. No. 14) eine Identität von 57,5% auf.

Weitere Beispiele für HPPD und HPPD-Gene lassen sich weiterhin  
5 beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 13 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der HPPD aus *Arabidopsis thaliana* (SEQ. ID. NO. 14).

15

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

20 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

25

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 13 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 13 stellt die genomische DNA aus *A. thaliana* dar, die die HPPD der Sequenz SEQ ID NO. 14 codiert.  
35

Alle vorstehend erwähnten HPPD-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix  
40 herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase  
45 und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren

werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Homogentisat-Phenyltransferase, im folgenden auch HPT genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure codierend eine HPT in den Organismus.

- 10 Dazu kann prinzipiell jedes HPT-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine HPT codiert, verwendet werden.

Bei genomischen HPT-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende HPT zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

- 20 Beispiele für HPT-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine HPT aus *Arabidopsis thaliana* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 15, Protein: Seq. ID. No. 16) oder Nukleinsäuren, codierend eine HPT aus *Glycine max*, *Heliantus annuus*, *Nicotiana tabacum*, *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare* oder *Syn-  
25 echocystis sp. PCC6803*.

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres HPT-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform  
30 weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine HPT oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine HPT auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter  
35 Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter  
40 zugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 16, und die die enzymatische Eigenschaft einer HPT aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 16 stellt die Aminosäuresequenz der HPT  
45 aus *Arabidopsis thaliana* dar.

## 18

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 16 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 16, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

Weitere Beispiele für HPT und HPT-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 16 leicht auffinden.

Die HPT aus *Synechocystis sp. PCC6803* weist beispielsweise mit der HPT aus *Arabidopsis thaliana* (Seq. ID. No. 16) eine Identität von 40,9 % auf.

Weitere Beispiele für HPT und HPT-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 15 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der HPT aus *Arabidopsis thaliana* (SEQ. ID. NO. 16).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 15 in den Organismus ein.

## 19

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 15 stellt die genomische DNA aus *A. thaliana* dar, die die HPT der Sequenz SEQ ID NO. 16 codiert.

Alle vorstehend erwähnten HPT-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, im folgenden auch GGPPOR genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäuren codierend eine GGPPOR in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes GGPPOR-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine GGPPOR codiert, verwendet werden.

Bei genomischen GGPPOR-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende GGPPOR zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für GGPPOR-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine GGPPOR aus *Nicotiana tabacum* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 17, Protein: Seq. ID. No. 18) oder Nukleinsäuren, codierend eine GGPPOR aus *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Heliantus annuus*, *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare* oder *Synechocystis* sp. PCC6803.

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres GGPPOR-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine GGPPOR oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine GGPPOR auf.



## 20

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren 5 abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer GGPPOR aufweisen.

10

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 18 stellt die Aminosäuresequenz der GGPPOR aus *Nicotania tabacum* dar.

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % 15 auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 18 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 18, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

20

Weitere Beispiele für GGPPOR und GGPPOR-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 18 leicht auffinden. 25

Die GGPPOR aus *Arabidopsis thaliana* weist beispielsweise mit der GGPPOR aus *Nicotania tabacum* (Seq. ID. No. 18) eine Identität von 80 % auf.

30

Weitere Beispiele für GGPPOR und GGPPOR-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 17 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden. 35

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der GGPPOR aus *Nicotania tabacum* (SEQ. ID. NO. 18). 40

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich. 45

## 21

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht 5 ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

10

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 17 in den Organismus ein.

15 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 17 stellt die genomische DNA aus *Nicotiana tabacum* dar, die die GGPPOR der Sequenz SEQ ID NO. 18 codiert.

Alle vorstehend erwähnten GGPPOR-Gene sind weiterhin in an sich 20 bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode 25 (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory 30 manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, im folgenden auch MT1 35 genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäuren codierend eine MT1 in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes MT1-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine MT1 codiert, verwendet werden.

40

Bei genomischen MT1-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende MT1 zu exprimieren, bevorzugt bereits 45 prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

## 22

Beispiele für MT1-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine MT1 aus *Synechocystis sp. PCC6803* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 19, Protein: Seq. ID. No. 20).

- 5 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres MT1-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine MT1 oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine MT1 auf.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 20, und die die enzymatische Eigenschaft einer MT1 aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 20 stellt die Aminosäuresequenz der MT1 aus *Synechocystis sp. PCC6803* dar.

- 25 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 20 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 20, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

- Weitere Beispiele für MT1 und MT1-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 20 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für MT1 und MT1-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 19 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine ko-

## 23

dieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der MT1 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (SEQ. ID. NO. 20).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rück-  
5 übersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden.  
10 Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so  
15 ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 19 in den Orga-  
20 nismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 19 stellt die genomische DNA aus *Synechocystis* sp. PCC6803 dar, die die MT1 der Sequenz SEQ ID NO. 20 codiert.  
25

Alle vorstehend erwähnten MT1-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix  
30 herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase  
35 und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tocopherolcyclase,  
40 im folgenden auch CYC genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäuren codierend eine CYC in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes CYC-Gen, also jede Nukleinsäure, die  
45 eine CYC codiert, verwendet werden.

Bei genomischen CYC-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende CYC zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für CYC-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine CYC aus *Synechocystis sp. PCC6803* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 21, Protein: Seq. ID. No. 22) oder Nukleinsäuren, codierend eine CYC aus *Glycine max*, *Heliantus annuus*, *Nicotiana tabacum*, *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* oder *Hordeum vulgare*.

15 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres CYC-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine CYC oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine CYC auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 22 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 22, und die die enzymatische Eigenschaft einer CYC aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 22 stellt die Aminosäuresequenz der CYC aus *Synechocystis sp. PCC6803* dar.

35 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 22 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 22, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

Weitere Beispiele für CYC und CYC-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 22 leicht auffinden.

Die CYC aus *Arabidopsis thaliana* weist beispielsweise mit der CYC aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (Seq. ID. No. 22) eine Identität von 29,1 % auf.

5 Weitere Beispiele für CYC und CYC-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 21 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Tocopherolcyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der CYC aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (SEQ. ID. NO.

15 22).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

20

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht

25 ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

30

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 21 in den Organismus ein.

35 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 21 stellt die genomische DNA aus *Synechocystis* sp. PCC6803 dar, die die CYC der Sequenz SEQ ID NO. 22 codiert.

Alle vorstehend erwähnten CYC-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode  
45 (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase

und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase, im folgenden auch  $\gamma$ -TMT genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäuren codierend eine  $\gamma$ -TMT in den Organismus.

10

Dazu kann prinzipiell jedes  $\gamma$ -TMT-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine  $\gamma$ -TMT codiert, verwendet werden.

Bei genomischen  $\gamma$ -TMT-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen

- 15 Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende  $\gamma$ -TMT zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

20

Beispiele für  $\gamma$ -TMT-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine  $\gamma$ -TMT aus *Arabidopsis thaliana* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 23, Protein: Seq. ID. No. 24) oder Nukleinsäuren, codierend eine  $\gamma$ -TMT aus *Glycine max*, *Heliantus annuus*, *Nicotiana tabacum*, *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare* oder *Synechocystis* sp. PCC6803.

25

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens

30 ein weiteres  $\gamma$ -TMT-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine  $\gamma$ -TMT oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine  $\gamma$ -TMT auf.

- 35 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 24 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 24, und die die enzymatische Eigenschaft einer  $\gamma$ -TMT aufweisen.

40

- 45 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 24 stellt die Aminosäuresequenz der  $\gamma$ -TMT aus *Arabidopsis thaliana* dar.

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 24 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 24, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

Weitere Beispiele für  $\gamma$ -TMT und  $\gamma$ -TMT-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 24 leicht auffinden.

Die  $\gamma$ -TMT aus *Synechocystis* sp. PCC6803 weist beispielsweise mit der  $\gamma$ -TMT aus *Arabidopsis thaliana* (Seq. ID. No. 24) eine Identität von 26,7 % auf.

Weitere Beispiele für  $\gamma$ -TMT und  $\gamma$ -TMT-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 23 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der  $\gamma$ -TMT aus *Arabidopsis thaliana* (SEQ. ID. NO. 24).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 23 in den Organismus ein.



Die Sequenz SEQ. ID. NO. 23 stellt die genomische DNA aus *A. thaliana* dar, die die  $\gamma$ -TMT der Sequenz SEQ ID NO. 24 codiert.

Alle vorstehend erwähnten  $\gamma$ -TMT-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Organismen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität, Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität und Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität auf.

Unter einer reduzierten Aktivität wird sowohl die reduzierte als auch das komplette Ausschalten der Aktivität verstanden. Eine Reduzierung einer Aktivität umfasst demnach auch eine mengenmässige Verringerung des entsprechenden Proteins in dem Organismus bis hin zu einem vollständigen Fehlen des entsprechenden Proteins, beispielsweise zu testen durch eine fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Enzymaktivität oder eine fehlende immunologische Nachweisbarkeit der entsprechenden Proteine.

Unter Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Homogentisat-Dioxygenase verstanden.

Unter einer Homogentisat-Dioxygenase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Homogentisat in Maleylacetoacetat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Homogentisat-Dioxygenase umgesetzte Menge Homogentisat bzw. gebildete Menge Maleylacetoacetat verstanden.

Bei einer reduzierten Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Homogentisat-Dioxygenase die

umgesetzte Menge Homogentisat bzw. die gebildete Menge Maleylacetoacetat reduziert.

Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %. Besonders bevorzugt ist die Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

10 Unter Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Maleylacetoacetat-Isomerase verstanden.

Unter einer Maleylacetoacetat-Isomerase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Maleylacetoacetat  
15 in Fumarylacetoacetat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Maleylacetoacetat-Isomerase umgesetzte Menge Maleylacetoacetat bzw. gebildete Menge  
20 Fumarylacetoacetat verstanden.

Bei einer reduzierten Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Maleylacetoacetat-Isomerase die  
25 umgesetzte Menge Maleylacetoacetat bzw. die gebildete Menge Fumarylacetoacetat reduziert.

Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens  
30 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %. Besonders bevorzugt ist die Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

Unter Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Fumarylacetoacetat-Hydrolase verstanden.  
35

Unter einer Fumarylacetoacetat-Hydrolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Fumarylacetoacetat in Fumarat umzuwandeln.  
40

Dementsprechend wird unter Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Fumarylacetoacetat-Hydrolase umgesetzte Menge Fumarylacetoacetat bzw. gebildete Menge Fumarat verstanden.  
45

Bei einer reduzierten Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Fumarylacetoacetat-Hydrolase die umgesetzte Menge Fumarylacetoacetat bzw. die gebildete Menge 5 Fumarat reduziert.

Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %.  
10 Besonders bevorzugt ist die Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

Die Homogentisat-Dioxygenase wird im folgenden auch als HGD bezeichnet, die Maleylacetoacetat-Isomerase wird im folgenden auch 15 als MAAI bezeichnet und die Fumarylacetoacetat-Hydrolase wird im folgenden auch als FAAH bezeichnet.

Es zahlreiche Möglichkeiten, um die HGD-, MAAI- und/oder FAAH-Aktivität in gewünschter Weise zu reduzieren.

20 Eine mögliche Methode umfasst die Verwendung mindestens einer Nukleinsäuresequenz, im folgenden auch anti-HGD, anti-MAAI bzw. anti-FAAH genannt, welche zu einer antisense-Nukleinsäuresequenz transkribierbar ist, die zur Inhibition der HGD-, MAAI- und/oder 25 FAAH-Aktivität befähigt ist, beispielsweise indem sie die Expression von endogener HGD, MAAI und/oder FAAH inhibiert.

Diese anti-HGD, anti-MAAI oder anti-FAAH-Nukleinsäuresequenzen können gemäß einer bevorzugten Ausführungsform die in antisense- 30 Orientierung insertierte kodierende Nukleinsäuresequenz der HGD MAAI und/oder FAAH oder funktional äquivalente Fragment der jeweiligen Sequenzen enthalten.

Vorteilhaft kann die antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Ribozyme sind katalytisch aktive RNA 35 Sequenzen, die gekoppelt an die antisense Sequenzen, die Zielsequenzen katalytisch spalten (Tanner NK. FEMS Microbiol Rev. 1999; 23 (3):257-75). Dies kann die Effizienz einer anti-sense Strategie erhöhen.

40 Weitere Methoden zur Reduzierung der HGD-, MAAI- und/oder FAAH-Expression, insbesondere in Pflanzen als Organismen umfassen die zu Kosuppression führende Überexpression homologer HGD-, MAAI- und/oder FAAH-Nukleinsäuresequenzen (Jorgensen et al., Plant Mol. 45 Biol. 1996, 31 (5):957-973) oder die Induktion des spezifischen RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon) (Angell, SM et al., Plant J. 1999,

20(3):357-362). Diese Methoden werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) bezeichnet.

Weitere Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in  
5 das Endogen mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in  
die Pflanze (Zhu et al., Nat. Biotechnol. 2000, 18(5):555-558)  
oder die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B.  
T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992,  
20(5):963-976) oder homologer Rekombination (Hohn, B. und Puchta,  
10 H, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999, 96:8321-8323.). Ferner ist  
eine Genüberexpression oder -repression auch mit spezifischen  
DNA-bindenden Faktoren z.B. mit den oben erwähnten Faktoren vom  
Typus der Zinkfingertranskriptionsfaktoren. Ferner können Fakto-  
ren in eine Zelle eingebracht werden, die das Zielprotein selber  
15 inhibieren. Die Protein-bindenden Faktoren können z.B. Aptamere  
sein (Famulok M, und Mayer G. Curr Top Microbiol Immunol. 1999;  
243:123-36).

Eine weitere Methode zur Reduzierung mindestens einer der vorste-  
20 hend beschriebenen Aktivitäten ist die Verwendung von RNA die  
einem Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem  
Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil der  
zu reduzierenden Zielsequenz identisch ist. Eine ausführliche Be-  
schreibung dieser Methode, die auch RNAi-Technologie genannt  
25 wird, ist in WO 99/32619 offenbart.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die zusätzlichen Re-  
duzierung mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der  
Gruppe HGD-, MAAI- und FAAH-Aktivität durch Reduzierung der Ge-  
30 nexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der  
Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Dioxygenase,  
Nukleinsäuren kodierend eine Maleylacetoacetat-Isomerase und Nuk-  
leinsäuren kodierend eine Fumarylacetoacetat-Hydrolase gegenüber  
dem Wildtyp.

35 Eine Reduzierung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure,  
ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Homogenti-  
sat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Maleylacetoacetat-  
Isomerase und Nukleinsäuren kodierend eine Fumarylacetoacetat-Hy-  
40 drolase gegenüber dem Wildtyp kann, wie vorstehend beschrieben,  
bevorzugt durch Verwendung folgender Methoden erreicht werden:

- a) Einführung von antisense-Nukleinsäuresequenzen;
- 45 b) Einführung von antisense-Nukleinsäuresequenzen kombiniert mit  
einem Ribozym-Verfahren

- c) Einführung von für homologe HGD-, MAAI und/oder FAAH-kodierende und zu Kosuppression führende Nukleinsäuresequenzen
  - d) Einführung von HGD-, MAAI und/oder FAAH-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukte;
  - e) Einführung von Nonsense-Mutanten von endogenen HGD-, MAAI und/oder FAAH kodierenden Nukleinsäuresequenzen;
  - f) Einführung von Knockout-Mutanten;
  - g) Einführung von zu homologer Rekombination geeigneten Nukleinsäuresequenzen;
  - h) Einführung von RNA, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil der Organismus eigenen Ziel-Nukleinsäuresequenz identisch ist.
- Auch eine kombinierte Anwendung der vorstehend beschriebenen Methoden ist denkbar.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Organismen eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität auf.

Dies wird besonders bevorzugt dadurch erreicht, daß man in den Organismus eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil der Organismus eigenen Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxygenase identisch ist. Eine ausführliche Beschreibung dieser Methode, die auch RNAi-Technologie genannt wird, ist in WO 99/32619 offenbart.

Je nach verwendetem Organismus ist demnach ein unterschiedliches Teilfragment der Organismus eigenen Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxygenase, zu verwenden.

SEQ. ID. No. 25 stellt beispielsweise ein Teilfragment der HGD-codierenden Nukleinsäure aus *Brassica napus* dar, welches, in ein entsprechendes RNAi-Konstrukt integriert, die HGD-Aktivität in *Brassica napus* reduziert.

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung von Organismen, insbesondere von Pflanzen, die gegenüber dem Wildtyp

5

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

10

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte  
15 Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

20

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Tocopherolcyclase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte  
25  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

30 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine reduzierte Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine reduzierte Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität aufweisen,

35

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

40 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte  
45 Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

- 5 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Tocopherolcyclase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte  
10  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,  
15

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,  
20

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,  
25

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Tocopherolcyclase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,  
30

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,  
35

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,  
40

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytylhydro-

## 35

chinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte  
5 Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und ein Tocopherolcyclase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

10 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität und eine g-Tocopherol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

15 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität,  
25 und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, Tocopherolcyclase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

30 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine und eine g-Tocopherol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine Tocopherolcyclase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

45 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine Tocopherolcyclase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,



phosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine g-Tocopherol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

5

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine Tocopherolcyclase-Aktivität, und eine g-Tocopherol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

10

Unter Organismen werden erfindungsgemäß prokaryontische

- 15 Organismen oder eukaryontische Organismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen, Moose, Pilze oder Pflanzen, verstanden, die in der Lage sind, als Wildtyp oder durch genetische Veränderung Vitamin E herzustellen. Bevorzugte Organismen sind photosynthetisch aktive Organismen, wie beispielsweise Cyanobakterien, Moose, Algen oder Pflanzen, die bereits als Wildtyp in der Lage sind, Vitamin E herzustellen.

Besonders bevorzugte Organismen sind Pflanzen.

- 25 Bevorzugte Pflanzen sind Tagetes, Sonnenblume, Arabidopsis, Tabak, Roter Pfeffer, Soja, Tomate, Aubergine, Paprika, Möhre, Karotte, Kartoffel, Mais, Salate und Kohlrarten, Getreide, Alfalfa, Hafer, Gerste, Roggen, Weizen, Triticale, Hirse, Reis, Luzerne, Flachs, Baumwolle, Hanf, Brassicaceen wie  
30 beispielsweise Raps oder Canola, Zuckerrübe, Zuckerrohr, Nuß- und Weinspezies oder Holzgewächse wie beispielsweise Espe oder Eibe.

Besonders bevorzugt sind *Arabidopsis thaliana*, *Tagetes erecta*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, Sonnenblume, Canola, Kartoffel

- 35 oder Soja.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Vitamin E wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Organismen, im folgenden auch transgene Organismen bezeichnet,

- 40 ein Ernten der Organismen und ein Isolieren von Vitamin E aus den Organismen angeschlossen.

Das Ernten der Organismen erfolgt in an sich bekannter Weise dem jeweiligen Organismus entsprechend. Mikroorganismen, wie

- 45 Bakterien, Moose, Hefen und Pilze oder Pflanzenzellen, die durch Fermentation in flüssigen Nährmedien kultiviert werden, können beispielsweise durch Zentrifugieren, Dekantieren oder Filtrieren

## 37

abgetrennt werden. Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

Die Isolierung von Vitamin E aus der geernteten Biomasse erfolgt  
5 in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemische oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie.

10

Die Isolierung von Vitamin E aus Öl-haltigen Pflanzen erfolgt beispielsweise bevorzugt durch chemische Umwandlung und Destillation aus Pflanzenölen oder aus den bei der Desodorierung pflanzlicher Öle anfallenden Wasserdampfdestillate (Dämpfer-  
15 kondensate).

Weitere Isolierverfahren von Vitamin E aus Dämpferkondensaten sind beispielsweise in DE 31 26 110 A1, EP 171 009 A2, GB 2 145 079, EP 333 472 A2 und WO 94/05650 beschrieben.

20

Die Herstellung der transgenen Organismen, insbesondere Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangsorganismen, insbesondere Pflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine  
25 Tyrosinaminotransferase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte zusätzlich eine, zwei oder drei Nukleinsäuren, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Me-  
35 thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

40

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthalten die vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte zusätzlich funktionell verknüpft eine RNA, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz  
45 aufweist, die mit einem Teil einer Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxygenase identisch ist.

Es ist, insbesondere in Pflanzen, technisch nur schwer zu realisieren, mehr als vier Aktivitäten mit einem Nukleinsäurekonstrukt zu erhöhen oder zu erniedrigen. Daher werden bevorzugt Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten verwendet um die Aktivitäten, 5 insbesondere um mehr als 4 Aktivitäten im Organismus zu erhöhen oder zu erniedrigen.

Es ist jedoch auch möglich, genetisch veränderte Organismen zu kreuzen, die bereits veränderte Aktivitäten enthalten. Beis- 10 pielsweise ist es durch Kreuzen von genetisch veränderten Organismen, die jeweils zwei veränderte Aktivitäten enthalten, möglich, Organismen mit vier veränderten Aktivitäten herzustellen. Gleiches kann auch erreicht werden, indem man eine Kombination von zwei Nukleinsäurekonstrukten die jeweils 2 Aktivitäten verän- 15 dern in den Organismus einführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die bevorzugten genetisch veränderten Organismen durch Einbringen von Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten hergestellt.

20 Dementsprechend betrifft die Erfindung insbesondere eine Kombination aus Nukleinsäurekonstrukten, wobei die Kombination ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase, funktionell 25 verknüpft mit einem oder mehreren Regulationssignalen, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten, und

a) mindestens ein weiteres Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe A bis F

30 A Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

35 B Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Homogentisat-Phytyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten und

40 C Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten, 45 leisten,

## 39

D Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,  
5 leisten,

E Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Tocopherolcyclase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription  
10 und Translation in Organismen gewährleisten und

F Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die  
15 Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

oder

b) mindestens ein weiteres Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend  
20 zwei, drei oder vier Nukleinsäurekonstrukte, ausgewählt aus der Gruppe der Nukleinsäurekonstrukte A bis F,

umfasst.

25 Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierenden Nukleinsäuresequenzen mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

30

Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner Nukleinsäurekonstrukte, insbesondere als Expressionskassette fungierende Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase, die mit einem oder mehreren  
35 Regulationssignalen funktionell verknüpft ist, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Pflanzen gewährleisten.

Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere  
40 Promotoren, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Pflanzen gewährleisten.

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der  
45 kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor

und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter  
5 einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

10

Bei der Verwendung von Pflanzen als Organismus enthalten die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte und Expressionskassetten vorzugsweise eine Nukleinsäure kodierend ein plastidäres Transitpeptid, das die Lokalisation in Plastiden gewährleistet.

15

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

20

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER),  
25 im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

30 Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor  
35 aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989),  
40 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des Ziel-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Der-  
45 artige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-indu-

## 41

zierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WQ 93/21334) Promotor können beispielsweise verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Vitamin E bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-245).

15

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459-467), LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995), Sucrose-Bindeprotein-Promotor (Zitat), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

Der Biosyntheseort von Vitamin E ist in Pflanzen unter anderem das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodierend eine Tyrosinaminotransferase sinnvoll ist. Dies ist jedoch nicht einschränkend, da die Expression auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - besonders in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform betrifft deshalb eine samenspezifische Expression der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression von exogenen Zielgenen von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression der transgen exprimierten Zielgene kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des Ziel-Gens und deren Auswirkung auf die Vitamin E-

Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise  
 5 durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Ziel-Nukleinsäure und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Ziel-Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations-  
 10 und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory,  
 15 Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind insertierte Nukleinsäure-Sequenzen,  
 20 die ein Targeting in den Plastiden gewährleisten.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ziel-Protein-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die  
 25 Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des Ziel-Proteins in die Chloroplasten vom Ziel-Protein-Teil enzymatisch abgespalten werden.

30 Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem  
 35 Äquivalent abgeleitet ist.

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente  
 40 mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
 45 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA  
 ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCGTACTCCTTCCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCG

TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGGGA  
TCC\_BamHI

pTP10

5

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGCTG

10 GATCC\_BamHI

pTP11

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
15 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGGGG  
ATCC\_BamHI

- 20 Ein weiteres Beispiel für ein plastidäres Transitpeptid ist das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana*.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch her-

- 25 gestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

- 30 Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

35

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die

- 40 Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Poly-

- 45 linker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis



## 44

6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

10

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

30 Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren kodierend ein Tyrosinaminotransferase oder der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder der Tyrosinaminotransferase zur Herstellung von transgenen Organismen, insbesondere Pflanzen.

35

Vorzugsweise weisen diese transgenen Pflanze gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Vitamin E auf.

Daher betrifft die Erfindung ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte zur Erhöhung des Gehalts an Vitamin E in Organismen, die als Wildtyp in der Lage sind, Vitamin E zu produzieren.

45

## 45

Es ist bekannt, daß Pflanzen mit einem hohen Vitamin-E-Gehalt eine erhöhte Resistenz gegenüber abiotischem Streß aufweisen. Unter abiotischem Streß wird beispielsweise Kälte, Frost, Trockenheit, Hitze und Salz verstanden.

5

Daher betrifft die Erfindung weiterhin die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zur Herstellung transgener Pflanzen, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Resistenz gegenüber abiotischem Streß aufweisen.

10

Die vorstehend beschriebenen Proteine und Nukleinsäuren können zur Herstellung von Feinchemikalien in transgenen Organismen, vorzugsweise zur Herstellung von Vitamin E in transgenen Pflanzen verwendet werden.

15

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom eines Organismus, insbesondere einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

Dazu können insbesondere bei Pflanzen an sich bekannte Methoden

20 zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die

25 Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch Agrobacterium  
30 vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.  
35 42 (1991), 205-225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res.

40 12 (1984), 8711).

Dementsprechend betrifft die Erfindung weiterhin Vektoren enthaltend die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten.

45

## 46

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien 5 kultiviert werden.

Die Expressionskassette kann über die Pflanzen hinaus auch zur Transformation von Bakterien, insbesondere Cyanobakterien, Moosen, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen eingesetzt werden.

10

Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Tyrosinaminotransferase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, 15 der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren.

Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise ver- 20 wundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in 25 Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die 30 Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Tyrosinaminotransferase kodierenden Nukleinsäure wird 35 eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" 40 (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in ein Derivat des Transformationsvektors pBin-19 mit 35s Promotor (Bevan, M., Nucleic Acids Research 12: 8711-8721 (1984)) ein- 45 gebaut werden.

## 47

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. 5 pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Die Erfindung betrifft daher ferner die Verwendung der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte, insbesondere der Expressionskassetten zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen oder zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzen- 10 teilen.

15 Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Gehaltes der Pflanze oder Pflanzenteile an Vitamin E.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch 20 in den Blättern, in den Samen, Blütenblättern oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen.

Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen indem man 25 eine vorstehend beschriebene Nukleinsäure oder ein vorstehend beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt oder eine vorstehend beschriebene Kombination von Nukleinsäurekonstrukten in das Genom des Ausgangsorganismus einführt.

30 Die Erfindung betrifft ferner die vorstehend beschriebenen genetisch veränderten Organismen selbst.

Wie vorstehend erwähnt, weisen die genetisch veränderte Organismen, insbesondere Pflanzen einen erhöhten Gehalt Vitamin E 35 auf.

Die Erhöhung der Tyrosinamintransferase-Aktivität im Organismus zu einem weiteren Effekt. Es wird nicht nur der Gesamt-Vitamin E-Gehalt erhöht sondern es erfolgt zusätzlich eine selektive 40 Erhöhung der Tocotrienole im Vergleich zu den Tocopherolen.

Als Organismen und zur Herstellung von Organismen mit einem erhöhten Gehalt an Feinchemikalien im Vergleich zum Wildtyp werden in einer bevorzugten Ausführungsform, wie vorstehend 45 erwähnt, photosynthetisch aktive Organismen wie beispielsweise Cyanobakterien, Moose, Algen oder Pflanzen, besonders bevorzugt

Pflanzen als Ausgangsorganismen und dementsprechend auch als genetisch veränderte Organismen verwendet.

Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren  
5 Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Bevorzugte Pflanzen sind, wie vorstehend ausgeführt Tagetes, Sonnenblume, Arabidopsis, Tabak, Roter Pfeffer, Soja, Tomate,  
10 Aubergine, Paprika, Möhre, Karotte, Kartoffel, Mais, Salate und Kohlarten, Getreide, Alfalfa, Hafer, Gerste, Roggen, Weizen, Triticale, Hirse, Reis, Luzerne, Flachs, Baumwolle, Hanf, Brassicaceen wie beispielsweise Raps oder Canola, Zuckerrübe, Zuckerrohr, Nuß- und Weinspezies oder Holzgewächse wie  
15 beispielsweise Espe oder Eibe.

Besonders bevorzugt sind *Arabidopsis thaliana*, *Tagetes erecta*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, Sonnenblume, Canola, Kartoffel oder Soja..

20

Die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Pflanzen können, können wie vorstehend beschrieben zur Herstellung von Vitamin E verwendet werden.

25 Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitamin-E können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden.

30

Die erfindungsgemäß, genetisch veränderten Pflanzen können ferner zur Herstellung von Vitamin E-haltigen Extrakten verwendet werden.

35 Erhöhung des Gehaltes an Vitamin E bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorzugsweise die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze, vorzugsweise für die Dauer mindestens einer Pflanzen-  
40 generation.

Unter einem erhöhten Gehalt an Vitamin E wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Tocopherol verstanden. Unter einem erhöhten Gehalt an Vitamin E wird aber auch insbesondere ein  
45 veränderter Gehalt der vorstehend beschriebenen 8 Verbindungen mit Tocopherolaktivität verstanden.

Beispielsweise führt das Einbringen eines Tyrosinaminotransferase-Gens in Pflanzen überraschenderweise zu einem besonders erhöhten Anstieg des Gehalts an Tocotrienolen.

- 5 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:  
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

10

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

15

Beispiel 1

Klonierung des Tyrosinaminotransferase-Gens kodierend die Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus*.

- 20 Die Präparation der RNA aus Rattenleber erfolgte in an sich bekannter Weise wie von S. Kar und B.J. Carr in Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995, 212(1), 21-6 (*Differential display and cloning of messenger RNAs from the late phase of rat liver regeneration*), beschrieben.

25

Die cDNA Synthese wurde unter Verwendung des SuperScript II cDNA Synthese Kit (Gibco BRL) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

- 30 Die Nukleinsäure kodierend eine Tyrosinaminotransferase wurde mittels *polymerase chain reaction* (PCR) aus *Rattus norvegicus* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (Tyrosinaminotransferase 5' SEQ.-ID Nr. 3) und eines antisense spezifischen Primers (Tyrosin-Aminotransferase 3' SEQ.-ID Nr. 4) amplifiziert.

35

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

40

- 2 µl einer *Rattus norvegicus* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)

- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP

45

- 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>

- 5 µg Rinderserum-Albumin

- 40 pmol Tyrosin-Aminotransferase 5' Primer

## 50

- 40 pmol Tyrosin-Aminotransferase 3'Primer
- 15 µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5 - 5 U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- 10 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)
- 15 Schritt 6: 4°C (Warteschleife)
- Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/RnTATase1 wurde durch Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) Primers und des
- 20 M13R Primers bestätigt (SEQ. ID. No. 1 und SEQ. ID. NO. 3).

#### Beispiel 2

- 25 Klonierung des Tyrosin-Aminotransferase-Gens 1 kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase 1 aus *Arabidopsis thaliana*.

- Die DNA kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (At1Tyrosin-Aminotransferase 5' SEQ. ID. No. 28) und eines antisense spezifischen Primers (At1Tyrosin-Aminotransferase 3' SEQ. ID. No. 29) amplifiziert.

- Die PCR Bedingungen waren die folgenden:  
Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 35
- 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
  - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
  - 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
  - 5µg Rinderserum-Albumin
  - 40 - 40pmol At1Tyrosin-Aminotransferase 5'Primer
  - 40pmol At1Tyrosin-Aminotransferase 3'Primer
  - 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
  - 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

- 45 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

## 51

- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C  
 Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)  
 Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)  
 30 Wiederholungen der Schritte 2-4  
 5 Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität  
 10 des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtTATAsel wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) Primers und des M13R bestätigt (Seq. ID. No. 5).

## Beispiel 3

- 15 Klonierung des Tyrosin-Aminotransferase-Gens 3 kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana*.

Die DNA kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana*.  
 20 unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (At3Tyrosin-Aminotransferase 5': SEQ. ID. No. 30) und eines antisense spezifischen Primers (At3Tyrosin-Aminotransferase 3': SEQ. ID. No. 31) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 25 Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 30 - 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol At3Tyrosin-Aminotransferase 5'Primer
- 40pmol Ar3Tyrosin-Aminotransferase 3'Primer
- 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 35 - 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)  
 40 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C  
 Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)  
 Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)  
 30 Wiederholungen der Schritte 2-4  
 Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)



## 52

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtTATAse3 wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und 5 des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. Nr. 7).

## Beispiel 4

Klonierung des Tyrosin-Aminotransferase-Gens 5 kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana*.

10

Die DNA kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (At5Tyrosin-Aminotransferase 5': SEQ. ID. No. 32) und eines antisense spezifischen Primers (At5Tyrosin-Aminotransferase 3': SEQ. ID. No. 33) 15 amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten 20 war:

- 2µl einer *Arabidopsis thaliana*.cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 25 - 40pmol At5Tyrosin-Aminotransferase 5'Primer
- 40pmol At5Tyrosin-Aminotransferase 3'Primer
- 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

30

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

35 Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)

Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

40

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtTATAse5 wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 9).

45

## 53

## Beispiel 5

Klonierung des Tyrosin-Aminotransferase-Gens 6 kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana*.

- 5 Die DNA kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 wird mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (At6Tyrosin-Aminotransferase 5': SEQ. ID. No. 34) und eines antisense spezifischen Primers (At6Tyrosin-Aminotransferase 3': SEQ. ID. No. 35)
- 10 amplifiziert.  
Die PCR Bedingungen waren die folgenden:  
Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:
- 15 - 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
  - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
  - 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
  - 5µg Rinderserum-Albumin
  - 40pmol At6Tyrosin-Aminotransferase 5'Primer
  - 40pmol Ar6Tyrosin-Aminotransferase 3'Primer
  - 20 - 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
  - 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wird unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- 25 Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

- Das Amplikon wird unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität
- 35 des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtTATase6 wird durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. Nr. 11).

## Beispiel 6

- 40 Klonierung des Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gens kodierend für die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum*

- Die DNA kodierend für Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase
- 45 -Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Nicotiana tabacum* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase 5': SEQ. ID. NO. 36) und

## 54

eines antisense spezifischen Primers (Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase 3': SEQ. ID. No. 37) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

5 Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2µl einer *Nicotiana tabacum* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 10 - 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase 5'Primer
- 40pmol Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase 3'Primer
- 15µl 3,3x rTth- DNA Polymerase Puffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase (PE Applied Biosystems)

15 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)

20 Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den

25 PCR Klonierungsvektor pGEMTe (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/NtGGPPOR wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 17).

30

Beispiel 7

Klonierung des Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gens kodierend für die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana*.

35

Die DNA kodierend für das Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AtHydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase 5': SEQ. ID. No. 38) und eines an-

40 tisense spezifischen Primers (AtHydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase 3': SEQ. ID. Nr. 39) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten

45 war:

- 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA

## 55

- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol AtHydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase 5'Primer
- 40pmol AtHydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase 3'Primer
- 5 - 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

10

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

Schritt 3: 1 Minute 58°C (Annealing)

Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)

15 30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtHPPD wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des

20

M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 13).

#### Beispiel 8

Klonierung des Homogentisat-Prenyltransferase-Gens kodierend für

25

die Homogentisat-Prenyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*.

Die DNA kodierend für das Homogentisinsäure-Prenyltransferase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers

30

(AtHomogentisat-Prenyltransferase 5': SEQ. ID. Nr. 40) und eines antisense spezifischen Primers (AtHomogentisat-Prenyltransferase 3': SEQ. ID. No. 41) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

35

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 40 - 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol AtHomogentisinsäure-Prenyltransferase 5'Primer
- 40pmol AtHomogentisinsäure-Prenyltransferase 3'Primer
- 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 45 - 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

## 56

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)  
 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C  
 Schritt 3: 1 Minute 58°C (Annealing)  
 Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)  
 5 30 Wiederholungen der Schritte 2-4  
 Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität  
 10 des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtHPT wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 15).

## Beispiel 9

- 15 Klonierung des 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Gens kodierend für die 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803.  
 20 Die DNA kodierend für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase 5': SEQ. ID. No. 42)  
 25 und eines antisense spezifischen Primers (2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase 3': SEQ. ID. No. 43) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 30 Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:
- 2µl einer *Synechocystis* sp. PCC6803 DNA
  - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
  - 35 - 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
  - 5µg Rinderserum-Albumin
  - 40pmol 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase 5'Primer
  - 40pmol 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase 3'Primer
  - 40 - 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
  - 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- 45 Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)  
 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C  
 Schritt 3: 1 Minute 58°C (Annealing)

## 57

Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

- 5 Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/SynMT1 wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq ID. No. 19).

10

Beispiel 10

Klonierung des Tocopherolcyclase-Gens (auch 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase-Gen genannt) kodierend für die Tocopherolcyclase (auch 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase ge-

- 15 nannt) aus *Synechocystis* sp. PCC6803.

Die DNA kodierend für 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Verwendung eines sense spezifischen Pri-

- 20 mers (2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase 5': SEQ. ID. No. 44) und eines antisense spezifischen Primers (2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase 3': SEQ.-ID Nr. 45) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 25 Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2µl einer *Synechocystis* sp. PCC6803 DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 30 - 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase 5'Primer
- 40pmol 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase 3'Primer
- 15µl 10 x PfuI-Turbo DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U PfuI-Turbo DNA Polymerase (Stratagene)

35

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

- 40 Schritt 3: 1 Minute 60°C (Annealing)

Schritt 4: 1,5 Minuten 72°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

- 45 Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pCRTopo4blunt (Invitrogen) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons imd Vektor pCR4topoblunt/SynCyc

## 58

wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-20) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 21).

## Beispiel 11

- 5 Klonierung des  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gens kodierend für die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*.

Die DNA kodierend für das  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis*

- 10 *thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (At $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase 5': SEQ. ID. No. 46) und eines antisense spezifischen Primers (At $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase 3': SEQ. ID. No. 47) amplifiziert.

- 15 Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 $\mu$ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2 $\mu$ l einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 20 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5 $\mu$ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol At $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase 5'Primer
- 40pmol At $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase 3'Primer
- 15 $\mu$ l 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 25 - 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- 30 Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 58°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- 35 Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

- Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/At $\gamma$ TMT wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des
- 40 M13R Primers bestätigt (Seq. ID. Nr. 23).

## Beispiel 12

- 45 Klonierung eines Teilfragmentes des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens kodierend für die Homogentisinsäure-Dioxygenase aus *Brassica napus*.

## 59

Die DNA kodierend für ein Teilfragmentes des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Brassica napus* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (Homogentisinsäure-Dioxygenase 5': SEQ. ID. No. 48) und  
5 eines antisense spezifischen Primers (Homogentisinsäure-Dioxygenase 3': SEQ. ID. No. 49) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten  
10 war:

- 2µl einer *Brassica napus* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 15 - 40pmol Homogentisinsäure-Dioxygenase 5'Primer
- 40pmol Homogentisinsäure-Dioxygenase 3'Primer
- 15µl 3,3x rTth- DNA Polymerase Puffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase (PE Applied Biosystems)

20 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus-Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)
- 25 Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den  
30 PCR Klonierungsvektor pGEMTe (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/\*BnHGD wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 25).

### 35 Beispiel 13

Erzeugung des DNA Konstruktes zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisat-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*.

40 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die eine reduzierte Expression des Homogentisat-Dioxygenase Gens aus *Brassica napus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet. Dieser Vektor wurde so verändert,  
45 dass er den samenspezifischen Promotor des Vicilin Gens aus *Vicia faba* (Weschke W., Bassüner R., van Hai N., Czihal A., Bäumlein H., Wobus U. The structure of a *Vicia faba* Vicilin Gene. Bio-



- chem. Physiol. Pflanzen 183, 233-242 (1988)), und das 2. Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. (Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L., Rocha-Sosa M. Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. MGG (1990)), und das Terminationssignal-2 des Octopin-Synthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (Gielen et al. 1984) enthält.
- 10 Das DNA Fragment kodierend für das Teilfragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus* wurde als SacI/ScaI Fragment aus dem Plasmid pGEMTe/\*BnHGD in den mit SmaI geöffneten pSUN2-Pvic-STLS1-ocst kloniert, nachdem die überstehenden Enden des Fragmentes mit der T4 Polymerase in glatte Enden überführt wurden. Das resultierende Plasmid pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1-ocst wurde mit ScaI verdaut. In diesen linearisierten Vektor wurde erneut das Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus* als geglättetes SacI/ScaI Fragment aus dem Plasmid pGEMTe/\*BnHGD kloniert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die
- 20 beiden BnHGD-Fragmente in gegenläufiger Orientierung auf beiden Seiten des STLS1 Introns vorhanden sind. Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocst (Abbildung 1) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* bzw. *A.thaliana* Pflanzen verwendet.
- 25
- Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 1 beinhaltet den Promotor des Vicilin Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure Dioxygenase Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2. Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin-Gens.
- 30

#### Beispiel 14

- 35 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.
- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *A.thaliana*, *Nicotiana tabacum* bzw. *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (Patent WO 02/00900) verwendet. Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* Unknown-Seed-Protein-Gens (USPP) (Bäumlein H., Boerjan W., Nagy I., Bassüner R., van Montagu M., Inzé D., Wobus U. A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in
- 40
- 45

transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. MGG 225:459-467 (1991) ), die Sequenz kodierend für das Chloroplasten-Transitpeptid des *Vicia faba* Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) Gens (Guerineau F., Woolston S., Brooks L., Mullineaux P. An expression cassette for targeting foreign proteins into chloroplasts. Nucleic Acids Res 16(23): 11380. (1988)) und das Terminationssignal des Nopalins-Synthase Gens aus *A.tumefaciens* (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73.)  
 10 enthält.

Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus* wurde als EcoR5 Fragment aus dem Plasmid pGEMTe/RnTATase in den pSUN2-USPP-*rbcS*-nost kloniert, nachdem  
 15 dieser mit dem Restriktionsenzym SmaI verdaut wurde. Dadurch wurde eine Translationsfusion mit dem Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) erzeugt und somit ein Import der Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* in die Plastiden gewährleistet.

20

Dieses Plasmid (pSUN2USPP-*rbcS*-RnTATase-nost, Abbildung 2) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* bzw. *A.thaliana* Pflanzen verwendet.

25 Fragment A (678Bp) in Abbildung 2 beinhaltet den Promotor des Unknown-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D  
 30 (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalins-Synthase Gens aus *A.tumefaciens*.

#### Beispiel 15

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.  
 35

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase  
 40 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen  
 45 Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein" (USPP) (Bäumlein et al., 1991) und das Terminationssignal des Nopalins-Synthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (GIELEN, J., de BEUCKELEER,

M., SEURINCK, J., DEBROECK, H., de GREVE, H., LEMMERS, M., van MONTAGU, M., SCHELL, J. The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J.* 3: 835-846. (1984) enthält.

5

Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* wurde aus dem Plasmid pGEMTe/AtTATase1 als Sall Fragment isoliert, und nachdem die Sall Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt wurde, in den pSUN2-USPP-nosT kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym SmaI parzial verdaut wurde (Grösse des linearisierten Vektors 8250Bp).

10

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT, Abbildung3) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

15 Fragment A (678Bp) in Abbildung 3 beinhaltet den Promotor des Unknown-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1269 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens.

20

Beispiel 16

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

25

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

30

Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein" (USPP) (Bäumlein et al., 1991) und das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *Agrobacterium* (Gielen et al. 1984) enthält.

35

Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* wurde aus dem Plasmid pGEMTe/AtTATase3 als Sall Fragment isoliert, und nachdem das Sall Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt wurde, in den pSUN2-USPP-nosT kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym SmaI parzial verdaut wurde (Grösse des linearisierten Vektors 8250Bp).

40

Dieses Plasmid (pSUN2USPP-AtTATase3-nosT, Abbildung 4) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

45

## 63

Fragment A (678 Bp) in Abbildung 4 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1334 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens.

## Beispiel 17

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein" (USPP) (Bäumlein et al., 1991) und das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *Agrobacterium* (Gielen et al. 1984) enthält.

Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* wurde aus dem Plasmid pGEMTe/AtTATase5 als BamH1 Fragment isoliert, und nachdem das BamH1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt wurde, in den pSUN2-USPP-nosT kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym SmaI parzial verdaut wurde (Grösse des linearisierten Vektors 8250Bp).

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT, Abbildung5) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678 Bp) in Abbildung 5 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens.

## Beispiel 18

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen

## 64

Promotors exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

- Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein-Gens" (USPP) (Bäumlein et al., 1991) und das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *Agrobacterium* (Gielen et al. 1984) enthält. Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* wird aus dem Plasmid pGEMTe/AtTATase5 als SalI Fragment isoliert, die SalI Ende werden mit dem Klenow Enzym aufgefüllt, in den pSUN2-USPP-nosT kloniert, der mit dem Restriktionsenzym SmaI parcial wird (Grösse des linearisierten Vektors 8250Bp).
- 15 Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT, Abbildung6) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

- Fragment A (678 Bp) in Abbildung 6 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

## Beispiel 19

- 25 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.
- 30

- 35 Zuerst wurde der Vektor puc19 (New England Biolabs) so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des Legumin B4 Gens (Kafatos et al., 1986), und das Terminationssignal der Nopalin-Synthase aus *A. tumefaciens* (Depicker et al., 1982) enthält. Der resultierende Vektor heißt puc19-LeB4-nosT.

40

Das DNA Fragment kodierend für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* wurde als KpnI/SalI Fragment in puc19LeB4nosT kloniert, nachdem dieser mit den Restriktionsenzymen KpnI/SalI verdaut wurde.

45

## 65

Aus dem Vektor puc19-LeB4-NtGGPPOR-nosT, wurde die DNA bestehend aus LeB4-Promotor, Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen (Nucleotid 1 bis 1323 von Seq. ID 7) als Sma1/Hind3 Fragment isoliert und in den Vektor pSUN2 kloniert, nachdem dieser mit dem  
5 Restriktionsenzym Sma1/Hind3 verdaut wurde. Der daraus resultierende Vektor heißt pSUN2-LeB4-NtGGPPOR(nuc.1-1323). Aus dem Vektor puc19-LeB4-NtGGPPOR-nosT, wurde die DNA bestehend aus Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen (Nucleotid 1319 bis 1509 von Seq. ID. No 17), nos-Terminationssequenz als Hind3 Fragment  
10 gement isoliert und in den Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR(nuc.1-1323) eingefügt, nachdem dieser ebenfalls mit Hind3 geschnitten wurde.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT, Abbildung 7) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

15 Fragment A (2764 Bp) in Abbildung 7 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* und Fragment C kodiert (272Bp) für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

20

## Beispiel 20

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvate-dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

25

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate-dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (WO

30 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein-Gens" (USPP) (Bäumlein et al., 1988) und das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase-Gens aus *A.tumefaciens* (Depicker et al., 1982) enthält.  
35

Das DNA Fragment kodierend für das Hydroxyphenylpyruvate-dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* wird aus dem Plasmid pGEMTe/AtHPPD als BamH1/Sall Fragment isoliert und nachdem das BamH1 Ende und  
40 Sall Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt werden, in den mit dem Restriktionsenzym Sma1 parzial verdauten Vektor pSUN2-USPP-ocsT kloniert (Grösse des linearisierten Vektors 8691Bp).

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT, Abbildung 8) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.  
45

## 66

Fragment A (678 Bp) in Abbildung 8 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1338 Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

## Beispiel 21

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (Wo 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein-Gens" (USPP) (Bäumlein et al., 1991) und das Terminationssignal-1 des Nopalin-Synthase-Gens aus *A.tumefaciens* (Depicker et al., 1982) enthält.

Das DNA Fragment kodierend für das Homogentisinsäure Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* wird aus dem Plasmid pGEMTe/AtHPT als BamH1 Fragment isoliert, die BamH1 Ende werden mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den Sma1 parcial verdauten pSUN2-USPP-ocsT kloniert (Grösse des linearisierten Vektors 88691Bp).

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT, Abbildung 9) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A ( 678 Bp) in Abbildung 9 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1182 Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

## Beispiel 22

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon Methyltransferas aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kon-

trolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des LeguminB4-Gens (Kafatos et al., 1986), die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) und das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens aus *A.tumefaciens* (Depicker et al., 1982)) enthält.

10

Das DNA Fragment kodierend für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 wird aus dem Plasmid pGEMTe/SynMT1 als BamH1 Fragment isoliert, die BamH1 Ende werden mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den Sall verdauten pSUN2-Leb4P-IPP-nosT kloniert, dessen Sall Enden ebenfalls mit dem Klenow Enzym aufgefüllt werden. Dadurch wird eine Translationsfusion mit dem Transitpetid der IPP-2 erzeugt und somit ein Import der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase in den Chloroplasten gewährleistet.

Dieses Plasmid (pSUN2LeB4-IPP-SynMT1-nosT, Abbildung 10) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2764 Bp) in Abbildung 10 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957 Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803 und Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

### Beispiel 23

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (Wo 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des Legumin-B4-Gens (Kafatos et al., 1986), die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) und das Ter-



minationssignal des Nopalins-Synthase Gens aus *A. tumefaciens* (Depicker et al., 1982) enthält.

- Das DNA Fragment kodierend für das 2,3-Dimethyl-5-Phytylplasto-
- 5 chinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 wird aus dem Plasmid pGEMTe/SynCyc als BamH1 Fragment isoliert, die BamH1 Ende werden mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den SalI verdauten pSUN2-Leb4P-IPP-nost kloniert, dessen SalI Enden ebenfalls mit dem Klenow Enzym aufgefüllt werden. Dadurch wird eine Translati-
- 10 onsfusion mit dem Transitpetid der IPP-2 erzeugt und somit ein Import der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase in den Chloroplasten gewährleistet. Dieses Plasmid (pSUN2-Leb4P-IPP-SynCyc-nost, Abbildung 11) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.
- 15 Fragment A (2764 Bp) in Abbildung 11 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A. thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1100 Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. und
- 20 Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalins-Synthase-Gens.

#### Beispiel 24

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines
- 25 samenspezifischen Promotors.

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO
- 30 02/00900) verwendet.

- Zuerst wurde der Vektor puc19 (New England Biolabs) so verändert,
- 35 dass er den samenspezifischen Promotor des Sucrose-Binding-Protein-Gens (SBP-P) (DE 19852195 C2) und die 35s-Terminationssequenz des Blumenkohlmosaikvirus (FRANCK, A., GUILLEY, H., JONARD, G., RICHARDS, K., HIRTH, L. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. Cell 21: 285-294. (1980)) enthält. Der resultierende Vektor heißt puc19-SBPP-35ST.
- 40

- Das DNA Fragment kodierend für das  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* wurde als BamH1/SalI Fragment in puc19-SBPP-AtyTMT-35ST kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym BamH1/SalI verdaut wurde.
- 45

Mittels PCR wurde die Expressionkassette bestehend aus: SBP-Promotor,  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und 35sT Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (SBPP-XbaI 5': SEQ. ID. No. 50) und eines anti-  
 5 sense spezifischen Primers (35ST-XbaI 3': SEQ. ID. No. 51), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogene) kloniert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

10 Die PCR erfolgte in einem 50 $\mu$ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1 $\mu$ l einer puc19-SBPP-At $\gamma$ TMT-35ST Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 15 - 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5 $\mu$ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol SBPP-XbaI 5'Primer
- 40pmol 35ST-XbaI 3'Primer
- 5 $\mu$ l 10x PfuI DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U PfuI DNA Polymerase (Stratagene)

20 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)

25 Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

30 Das DNA Fragment bestehend aus SBP-Promotor,  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und 35ST Terminationssequenz wurde aus dem Plasmid pCR4TOP0blunt/SBPP- $\gamma$ TMT-35ST als XbaI Fragment isoliert und in den Vektor pSUN2 kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym XbaI verdaut wurde.

35 Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP- $\gamma$ TMT-35ST, Abbildung 12) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

40 Fragment A (1788Bp) in Abbildung 12 beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (1047Bp) kodiert für das  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (291Bp) kodiert für den 35s-Terminator des Blumenkohl-mosaikvirus.

Beispiel 25

45 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression des Tyrosin-Aminotransferase Gens aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors, in Kombination mit der samenspezifischen

schen Unterdrückung der Expression des Homogentisat-Dioxygenase Gens aus *Brassica napus*.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-  
 5 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren und gleichzeitig die samenspezifische Unterdrückung der Expression des Homogentisat-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* vermitteln, wurde der Vektor pSUN2-Pvic-  
 10 BnHGD\*-STLS1- $\alpha$ BnHGD\*-ocsT und der Vektor pSUN2USPP-rbcS-RnTATase-nosT, verwendet.

Aus dem Vektor pSUN2USPP-rbcS-RnTATase-nosT, wurde mittels PCR die Expressionkassette bestehend aus: USP-Promotor, rbcS Transit-  
 15 peptid, Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (USPP-Srf1 5': SEQ. ID. No. 52) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-Srf1 3': SEQ. ID. No. 53), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogene) kloniert.

20

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 $\mu$ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 25 - 1 $\mu$ l des pSUN2-USPP-rbcS-RnTATase-nosT Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5 $\mu$ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol USPP-Srf1 5'Primer
- 40pmol nosT-Srf1 3'Primer
- 30 - 5 $\mu$ l 10x Pfu1 Turbo DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U Pfu1 Turbo DNA Polymerase (Stratagene)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

35

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)

Schritt 4: 8 Minuten 68°C (Elongation)

40 30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, rbcS Transitpeptid, Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus* und nos Ter-  
 45 minationssequenz wurde aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnATase-nosT als Srf1 Fragment isoliert und in den

## 71

pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocstT kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym EcoR5 verdaut wurde.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocstT-USPP-rbcS-  
5 RnATase-nosT, Abbildung 13) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 13 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein-  
10 en Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus* und Fragment C (198Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens.  
15 Fragment F ( 678 Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (rbcS) aus *Vicia faba*. Fragment H (1365 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus* und Fragment I (272Bp) ko-  
20 diert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthese-Gens aus *Agrobakterium tumefaciens*.

## Beispiel 26

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-amino-  
25 transferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*

30 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch  
35 unterdrücken, wurden die Vektoren pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT und der Vektor pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocstT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend  
40 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1 Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wurde aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT als EcoR1/SmaI Fragment isoliert, das EcoR1 Ende wurde mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoR5 verdauten pSUNPvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocstT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT/USPP-AtTA-Tase1-nosT Abbildung 14) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

- 5 Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 14 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit
- 10 Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin-Gens. Fragment
- Fragment F ( 678Bp) beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP)aus *Vicia faba*, Fragment G (1269Bp) kodiert für
- 15 das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-Synthase Gens.

#### Beispiel 27

- 20 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure Dioxygenase Gens aus *Brassica napus*
- 25 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogen-
- 30 tisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, wurden die Vektoren pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT und der Vektor pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.
- 35 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT als EcoR1/SmaI Fragment isoliert, das EcoR1 wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoR5
- 40 verdauten pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT/USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 15) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

## 73

- Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 15 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment G (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-Synthase Gens.

## Beispiel 28

- 15 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin- Amino-transferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*
- 20 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, wurden die Vektoren pSUN2-USPP-AttTATase5-nost und der Vektor pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocst miteinander kombiniert.
- 25 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AttTATase5-nost als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoRI verdauten pSUNPvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocst kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocst/USPP-AttTATase5-nost Abbildung 16) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

## 40

- Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 16 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens.

## 74

Fragment F (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens.

## Beispiel 29

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, wurden die Vektoren pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT und der Vektor pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoRI verdauten pSUNPvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT/USPP-AtTATase6-nosT Abbildung 17) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 17 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des STLS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F ( 678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens.

## Beispiel 30

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphat-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LEB4-NtGGPPOR-nosT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTATase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen XhoI Enden zuvor mit dem Klenow Enzym geglättet werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT Abbildung 18) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

25

Fragment A (678Bp) in Abbildung 18 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *A. tumefaciens*.

Fragment E (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment F (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

Beispiel 31

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

45



Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT und pSUN2-USPP-AtTA-Tase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA-Tase1-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen XhoI Enden zuvor mit dem Klenow Enzym geglättet werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT/USPP-AtTA-Tase1-nosT Abbildung 19) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

Fragment A (678Bp) in Abbildung 19 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase-Gen aus *Nicotiana tabacum*. Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens.

### 30 Beispiel 32

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT und pSUN2-USPP-AtTA-Tase3-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA-

## 77

Tase3-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen XhoI Enden zuvor mit dem Klenow Enzym geglättet werden.

5

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 20) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

- 10 Fragment A (678Bp) in Abbildung 20 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und. Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum*. Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

## 20 Beispiel 33

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

25

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

- 30 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen XhoI Enden zuvor mit dem Klenow Enzym geglättet werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 21) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen

45 verwendet

Fragment A ( 678Bp) in Abbildung 21 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum*. Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens

10

#### Beispiel 34

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT und pSUN2-USPP-AtTA-Tase6-nosT miteinander kombiniert.

25

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA-Tase6-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen XhoI Enden zuvor mit dem Klenow Enzym geglättet werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-AtTATase6-nosT Abbildung 22) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A ( 678Bp) in Abbildung 22 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum*. Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens

## Beispiel 35

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Ara-*  
 5 *bidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase  
 10 aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTATase1-nosT miteinander kombiniert.

15 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-  
 20 AtHPPD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT Abbildung 23) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

25 Fragment A (678Bp) in Abbildung 23 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365Bp) kodiert  
 30 für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *A. tumefaciens*.

Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1338Bp) kodiert für das  
 35 Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

## Beispiel 36

40 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

45

## 80

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT /USPP-AtTATase1-nosT Abbildung 24) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

Fragment A (678Bp) in Abbildung 24 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

## Beispiel 37

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird

## 81

mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT /USPP-AtTATase3-nosT Ab-  
5 bildung 25) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678Bp) IN Abbildung 25 beinhaltet den Promotor des  
"Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B  
10 (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-  
15 Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.  
Beispiel 38

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-  
transferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa-  
20 menspezifischen Promotors und der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxyge-  
nase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-  
25 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT  
30 miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA-  
35 Tase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-SBPP-AtTMT-35sT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT /USPP-AtTATase5-nosT Ab-  
40 bildung 26) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678Bp) in Abbildung 26 beinhaltet den Promotor des  
"Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389Bp)  
45 kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den

Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

5

### Beispiel 39

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxyge-  
10 nase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6  
15 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPPD-ocst und pSUN2-USPP-AtTATase6-nost miteinander kombiniert.

20

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nost als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird  
25 mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPPD-ocst kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPPD-ocst/USPP-AtTATase6-nost Abbildung 27) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen  
30 verwendet

Fragment A (678Bp) in Abbildung 27 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis*  
35 *thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Ter-  
40 minationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

### Beispiel 40

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspe-  
45 zifischen Promotors und Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus

*Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPT-ocst und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTATase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPT-ocst kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocst/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT Abbildung 28) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678Bp) in Abbildung 28 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodierend für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *A. tumefaciens*.

Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

#### 35 Beispiel 41

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden



die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend  
5 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT kloniert.

10

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT/USPP-AtTATase1-nosT Abbildung 29) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

15 Fragment A (678Bp) in Abbildung 29 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*,  
20 Fragment E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phenyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopinsynthase Gens.

25 Beispiel 42

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phenyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors  
30

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Homogentisinsäure-Phenyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT miteinander kombiniert.

40 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor  
45 pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT /USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 30) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

- 5 Fragment A (678Bp) in Abbildung 30 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

#### 15 Beispiel 43

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

- 30 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT/USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 31) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

#### 40

- Fragment A (678Bp) in Abbildung 31 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytyltransferase-

Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

#### Beispiel 44

- 5 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors
- 10 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren,
- 15 werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPT-ocstT und pSUN2-USPP-AtTATase6-nostT miteinander kombiniert.
- Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis*
- 20 *thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nostT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPT-ocstT kloniert.
- 25 Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocstT/USPP-AtTATase6-nostT Abbildung 32) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

- Fragment A (678Bp) in Abbildung 32 beinhaltet den Promotor des
- 30 "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment
- 35 E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

#### Beispiel 45

- 40 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2-Me-

- 5 thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTA-Tasel-nosT miteinander kombiniert.

- Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotrans-  
10 ferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATasel-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

- 15 Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT/USPP-rbcS-RnTA-Tasel-nosT Abbildung 33) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

- Fragment A (2764Bp) in Abbildung 33 beinhaltet den Promotor des  
20 LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-  
25 lin-Synthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment G (1365Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Frag-  
30 ment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *A.tumefaciens*.

#### Beispiel 46

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-  
35 transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2-Me-  
thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors
- 40 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und 2-Me-  
thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp.  
45 PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren

pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend  
 5 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

10

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT/USPP-AtTATase1-nosT Abbildung 34) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

- 15 Fragment A (2764Bp) in Abbildung 34 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803.  
 20 Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-Synthase-Gens. Fragment E ( 678Bp) beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminati-  
 25 onssignal des Nopal-Synthase Gens.

#### Beispiel 47

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-  
 transferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa-  
 30 mensspezifischen Promotors und der 2-Me-  
 thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-  
 35 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2-Me-  
 thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren  
 40 pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT miteinander kombiniert.

- Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend  
 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis*  
 45 *thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird

mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT /USPP-AtTATase3-nosT  
5 Abbildung 35) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 35 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das  
10 Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des  
15 "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens.

## 20 Beispiel 48

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp.

25 PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen  
30 Promotors exprimieren, und die 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

35

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit  
40 dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT/USPP-AtTATase5-nosT  
Abbildung 36) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen  
45 verwendet:

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 36 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment E ( 678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens

#### Beispiel 49

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors
- 20 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

35

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT/USPP-AtTATase6-nosT Abbildung 37) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

- 40 Fragment A (2764Bp) in Abbildung 37 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803.
- 45 Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1243 Bp)

## 91

kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

## 5 Beispiel 50

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTATase1-nosT miteinander kombiniert.

20 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit EcoRI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoRI Enden ebenfalls  
25 aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT Abbildung 38) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

30 Fragment A (2764Bp) in Abbildung 38 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment E ( 678Bp) beinhaltet den Promotor des Unknown-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment G (1365Bp) kodiert für das  
35 Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *A.tumefaciens*.

## Beispiel 51

45 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-



nol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines  
samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-  
5 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1  
aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen  
Promotors exprimieren, und 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochoinol-Zy-  
klase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen expremie-  
ren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und  
10 pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA-15 Tase1-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoRI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoRI Enden mit dem Klenow Enzym aufgefüllt werden.

20 Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT/USPP-AtTATase1-nosT  
Abbildung 39) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflan-  
zen verwendet

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 39 beinhaltet den Promotor des  
25 LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das  
Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isome-  
rase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phy-  
tylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Frag-  
ment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-  
30 Synthase- Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des  
Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F  
(1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Ara-  
bidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminati-  
onssignal des Nopalin-Synthase Gens.

35

### Beispiel 52

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-  
transferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa-  
menspezifischen Promotors und der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplasto-  
40 nol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines  
samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen expremie-

ren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend  
 5 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoRI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoRI Enden ebenfalls  
 10 aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT/USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 40) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

15 Fragment A (2764Bp) in Abbildung 40 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A. thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phyt  
 20 tylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Ara*  
 25 *bidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens.

### Beispiel 53

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-  
 30 transferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2,3-Dimethyl-5-Phytlylplastocho-  
 nol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

35 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2,3-Dimethyl-5-Phytlylplastocho-  
 40 ren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis*  
 45 *thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoRI verdauten Vektor

pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoR1 Enden ebenfalls aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT /USPP-AtTATase5-nosT  
5 Abbildung 41) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 41 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das  
10 Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des  
15 "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens.

## 20 Beispiel 54

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines  
25 samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen  
30 Promotors exprimieren, und die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT miteinander kombiniert.

35 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT als SmaI/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoR1 verdauten  
40 Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoR1 Enden ebenfalls aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT/USPP-AtTATase6-nosT  
45 Abbildung 42) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 42 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

#### Beispiel 55

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-At $\gamma$ TMT-35sT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTATasel-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATasel-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-SBPP-At $\gamma$ TMT-35sT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP-At $\gamma$ TMT-35sT/USPP-rbcS-RnTATasel-nosT Abbildung 43) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

Fragment A (678Bp) in Abbildung 43 beinhaltet den Promotor des Unknown-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *A.tumefaciens*.

Fragment E (1788Bp) beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment F (1047Bp) kodiert für das  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment G (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohlmosaikvirus.

**Beispiel 56**

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der  $\gamma$ -Tocopherol Methyltransferase  
5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1  
10 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die  $\gamma$ -Tocopherol Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-At $\gamma$ TMT-35sT und pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT miteinander kombiniert.

15

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit  
20 dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-SBPP-At $\gamma$ TMT-35sT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2LeB4-SBPP-At $\gamma$ TMT-35sT/USPP-AtTATase1-nosT. Abbildung 44) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen  
25 verwendet:

Fragment A (678Bp) in Abbildung 44 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Ara-*  
30 *bidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens. Fragment D (1788Bp) beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1047Bp) kodiert für das  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment F (291Bp) kodiert für den 35S-Ter-  
35 minator des Blumenkohl-mosaikvirus.

**Beispiel 57**

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa-  
40 mensspezifischen Promotors und der  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3  
45 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase aus

*Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-AtyTMT-35sT und pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT miteinander kombiniert.

- 5 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor
- 10 pSUN2-SBPP-AtyTMT-35sT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP-AtyTMT-35sT/USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 45) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

- 15 Fragment A (678Bp) in Abbildung 45 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (1788Bp) beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1047Bp) kodiert für das  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment F (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohl-mosaikvirus.

25

#### Beispiel 58

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase
- 30 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5
- 35 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-AtyTMT-35sT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

40

- Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit
- 45 dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-SBPP-AtyTMT-35sT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP-At $\gamma$ TMT-35sT /USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 46) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

- 5 Fragment A (678Bp) in Abbildung 46 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (1788Bp) beinhaltet
- 10 den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1047Bp) kodiert für das  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment F (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohl-mosaikvirus.

#### 15 Beispiel 59

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen

#### 20 Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase aus

- 25 *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-At $\gamma$ TMT-35sT und pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend

30 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-SBPP-At $\gamma$ TMT-35sT kloniert.

#### 35

Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP-At $\gamma$ TMT-35sT/USPP-AtTATase6-nosT Abbildung 47) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

- 40 Fragment A (678Bp) in Abbildung 47 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment D (1788Bp) beinhaltet
- 45 den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1047Bp) kodiert für das  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis*

*thaliana*, Fragment F (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohl-mosaikvirus.

#### Beispiel 60

- 5 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*
- 10 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der
- 15 endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-LeB4-NtGGPPOR-nosT (s.u.) und pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.
- 20 Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: LeB4-Promotor, Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* und nos-Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (LeB4-SRF1 5': SEQ. ID. No. 54) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-SRF1 3' SEQ. ID. No.
- 25 53), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogene) kloniert.

Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-LeB4-NtGGPPOR-nosT  
Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 30 Die PCR erfolgte in einem 50 $\mu$ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1 $\mu$ l einer puc19-LeB4-NtGGPPOR-nosT Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 35 - 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5 $\mu$ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol LeB4-Srf1 5'Primer
- 40pmol nosT-Srf1 3'Primer
- 5 $\mu$ l 10x PfuI DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U PfuI DNA Polymerase (Stratagene)

- 40 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)

- 45 Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4



Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: LeB4-Promotor, Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-  
5 Gen aus *Nicotiana tabacum* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pCR4topoblunt-LeB4-NtGGPPOR-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit EcoRI verdauten pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT kloniert.

- 10 Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT/LeB4-NtGGPPOR-nosT Abbildung 48) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

- Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 48 beinhaltet den Promotor des  
15 Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp)  
20 kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment G (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-  
25 Synthase-Gens

#### Beispiel 61

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines  
30 samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*.

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-  
35 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-USPP-  
40 AtHPPD-ocsT (s.u.) und pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

- Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana*  
45 und ocs-Terminationssequenz-1, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (USPP-SRF1-5': SEQ. ID. No. 52) und eines antisense spezifischen Primers (ocsT-SRF1-3': SEQ. ID. No. 55), am-

## 101

plifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogene) kloniert. Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-USPP-AthHPPD-ocsT.

5 Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1µl einer pSUN2-USPP-AthHPPD-ocsT Plasmid-DNA
- 10 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5µg Rinder Serum-Albumin
- 40pmol USPP-SRF1 5'Primer
- 40pmol ocsT-SRF1 3'Primer
- 5µl 10x PfuI DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 15 - 5U PfuI DNA Polymerase (Stratagene)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

20 Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)

Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

25 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationsssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-AthHPPD-ocsT als SrfI Fragment isoliert und in den mit EcoRI verdauten Vektor pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1-α\*BnHGD-ocsT kloniert.

30

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1-α\*BnHGD-ocsT/USPP-AthHPPD-ocsT Abbildung 49) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

35 Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 49 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B

40

jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens.

Fragment F (678Bp) kodiert beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (1338Bp) kodiert

45

für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment H (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase.

## Beispiel 62

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Homogentisinsäure Phytlyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure Dioxygenase Gens aus *Brassica napus*

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Homogentisinsäure-Phytlyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure Dioxygenase Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-USPP-AtHPT-ocsT (siehe nachstehend) und pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: USP-Promotor, der Homogentisinsäure-Phytlyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (USPP-SRF1-5' SEQ. ID. No. 52) und eines antisense spezifischen Primers (ocsT-SRF1-3' SEQ. ID. No. 55), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogene) kloniert.

Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-USPP-AtHPT-ocsT. Die PCR Bedingungen waren die folgenden:  
Die PCR erfolgte in einem 50 $\mu$ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 30 - 1 $\mu$ l einer pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5 $\mu$ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol USPP-SRF1 5'Primer
- 40pmol ocsT-SRF1 3'Primer
- 35 - 5 $\mu$ l 10x PfuI DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U PfuI DNA Polymerase (Stratagene)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- 40 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
- Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)
- 45

## 103

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, der Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz-1 wird aus dem Plasmid pCR4TOPoblunt/USPP-AtHPT-ocsT als SrfI Fragment isoliert und in den mit EcoRI verdauten Vektor pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT/USPP-AtHPT-ocsT Abbildung 50) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

10

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 50 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-

- 15 LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (1182Bp) kodiert für das
- 20 Homogentisinsäure-Phytyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment H (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

## Beispiel 63

- 25 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*

30

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynMtl-nosT (s.u.) und pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

- 40 Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: LeB4-Promotor, die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 und nos-Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (LeB4-SRF1-5': SEQ. ID. No. 54) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-SRF1-3': SEQ. ID. No. 53), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt

## 104

(Invitrogene) kloniert. Das resultierende Plasmid ist pCR4topo-blunt-LeB4-IPP-SynMT1-nosT.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

5 Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1µl einer pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nosT Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 10 - 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol LeB4-SRF1 5'Primer
- 40pmol nosT-SRF1 3'Primer
- 5µl 10x PfuI DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U PfuI DNA Polymerase (Stratagene)

15 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94° (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°
- Schritt 3: 1 Minute 55° (Annealing)
- 20 Schritt 4: 10 Minuten 68° (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72° (Post-Elongation)

25 Das DNA Fragment bestehend aus LeB4-Promotor, die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) , der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol-Methyltranserese aus *Synechocystis spec* PC6808 und nos-erminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPO-blunt/LeB4-IPP-SynMT1-nosT als Srf1 Fragment isoliert und in den

30 mit EcoR5 verdauten Vektor pSUN2-ic-\*nHGD-STLS1-α\*nHGD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-\*nHGD-STLS1-α\*nHGD-ocsT/USPP-LeB4-IPP-SynMT1-nosT Abbildung 51) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

35

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 51 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein

40 en Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens

45 aus *Vicia faba*, Fragment G (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment H (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltrans-

ferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment I (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

#### Beispiel 64

- 5 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure Dioxygenase Gens aus *Brassica napus*
- 10 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression
- 15 der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynCyc-nosT (s.u.) und pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.
- 20 Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: LeB4-Promotor, die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *Arabidopsis thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis spec* PC6808 und nos-Terminationssequenz, unter
- 25 Verwendung eines sense spezifischen Primers (LeB4-EcoR5-5': SEQ. ID. No. 56) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-EcoR5-3': SEQ. ID. No. 57), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogene) kloniert. Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynMt1-nosT
- 30 Die PCR Bedingungen waren die folgenden:  
Die PCR erfolgte in einem 50 $\mu$ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:
- 35 - 1 $\mu$ l einer pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT Plasmid-DNA  
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP  
- 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>  
- 5 $\mu$ g Rinderserum-Albumin  
- 40pmol LeB4-EcoR5 5'Primer  
- 40pmol nosT-EcoR5 3'Primer
- 40 - 5 $\mu$ l 10x PfuI DNA Polymerase Puffer (Stratagene)  
- 5U PfuI DNA Polymerase (Stratagene)  
Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:
- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- 45 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
- Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das DNA Fragment bestehend aus LeB4-Promotor, die Sequenz kodier-  
 5 end für das Transitpeptid der *Arabidopsis thaliana* plastiden-spe-  
 zifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) , der  
 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp.  
 PCC6803 und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TO-  
 POblunt/LeB-IPP-SynCyc-nosT als EcoR5 Fragment isoliert und in  
 10 den mit EcoR5 verdauten Vektor pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-  
 ocstT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocstT/LeB-IPP-Syn-  
 Cyc-nosT Abbildung 52) wird zur Erzeugung transgener *Brassica na-*  
 15 *pus* Pflanzen verwendet:

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 52 beinhaltet den Promotor des  
 Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein-  
 en Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica*  
 20 *napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-  
 LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit  
 Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment  
 E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal des Octopin Gens.  
 Fragment F (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens  
 25 aus *Vicia faba*, Fragment G (235Bp) kodiert für das Transitpeptid  
 der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment H  
 (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol Zy-  
 klase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment I (272Bp) ko-  
 diert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

30

#### Beispiel 65

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der  $\gamma$ -Tocopherol Me-  
 thyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines  
 samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrück-  
 35 kung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus  
*Brassica napus*.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-  
 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die  $\gamma$ -Tocopherol Methyltrans-  
 40 ferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezi-  
 fischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen  
 Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezi-  
 fisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-SBPP-  
 YTMT-35sT (s.u.) und pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocstT mitein-  
 45 ander kombiniert.

Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: LeB4-Promotor, die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), der  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (SBPP-SRF1-5': SEQ. ID. No. 58) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-SRF1-3' SEQ. ID. No. 53), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogene) kloniert. Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-SBPP- $\gamma$ TMT-35sT.

10 Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 $\mu$ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1 $\mu$ l einer pSUN2-SBPP- $\gamma$ TMT-35sT Plasmid-DNA
- 15 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5 $\mu$ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol SBPP-SRF1 5'Primer
- 40pmol 35sT-SRF1 3'Primer
- 5 $\mu$ l 10x Pfu1 DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 20 - 5U Pfu1 DNA Polymerase (Stratagene)

Die PCR wird unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

25 Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)

Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

30 Das DNA Fragment bestehend aus LeB4-Promotor, die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), der  $\gamma$ -Tocopherol Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und nos- Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/SBPP- $\gamma$ TMT-35sT als Srf1

35 Fragment isoliert und in den mit EcoR5 verdauten Vektor pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocstT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocstT/SBPP- $\gamma$ TMT-35sT Abbildung 53) wird zur Erzeugung transgener *Brassica na-*

40 *pus* Pflanzen verwendet:

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 53 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica*

45 *napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-



LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (1788Bp) beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment G (1047Bp) kodiert für das  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment H (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohlmosaikvirus.

#### Beispiel 66

- 10 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

15

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-NtGGPPOR-nosT und pCR4topoblunt-USPP-AthHPPD-ocsT miteinander kombiniert.

- 25 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPoblunt/USPP-AthHPPD-ocsT als SrfI Fragment isoliert und in den mit SmaI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert.

- 30 Dieses Plasmid (pSUN2LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-AthHPPD-ocsT Abbildung 54) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

- Fragment A (678Bp) in Abbildung 54 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

#### Beispiel 67

- 45 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Homogentisin-säure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyro-

phosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nost und  
 5 pCR4topoblunt-USPP-AtHPT-ocsT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-AtHPT-ocsT als  
 15 SrfI Fragment isoliert und in den mit SmaI verdauten Vektor pSUN2-LeB-NtGGPPOR-nost kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nost/USPP-AtHPT-ocsT Abbildung 55) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen  
 20 verwendet:

Fragment A (678Bp) in Abbildung 55 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment F (272Bp) kodiert für das  
 25 Terminationssignal des Nopalins-Synthase-Gens.

#### Beispiel 68

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines  
 35 samenspezifischen Promotors, der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und  $\gamma$ -Tocopherol Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

40

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren und  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*

unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-AtyTMT35ST und pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pCR4topoblunt-USPP-AthHPPDocST miteinander kombiniert.

- 5 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz-1 wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-AthHPPD-ocsT als SrfI Fragment isoliert und in den mit SrfI verdauten Vektor
- 10 pSUN2-SBPP-AtyTMT 35ST kloniert, der zuvor ebenfalls mit dem Restriktionsenzym SrfI verdaut wird. In das entstandene Plasmid pSUN2-SBPP-AtyTMT-35sT/USPP-AthHPPD-ocsT, wird das DNA Fragment bestehend aus LeB-Promotor, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec*
- 15 PC6808 und nos-Terminationssequenz aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/LeB-SynMT1-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-SBPP-AtyTMT35sT/USPP-AthHPPD-ocsT kloniert, nachdem die XhoI Enden aufgefüllt wurden.
- 20 Dieses Plasmid pSUN2-SBPP-AtyTMT35sT/USPP-AthHPPD-ocsT/LeB-SynMT1-nosT Abbildung 56) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

- Fragment A (1788Bp) in Abbildung 56 beinhaltet den Promotor des
- 25 SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (1047Bp) kodiert für das  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment C (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohlmosaikvirus. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das
- 30 Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment G (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment H (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment I (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis sp.* PCC6803.
- 35 Fragment J (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalins-Synthase-Gens.

#### 40 Beispiel 69

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors, der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec*
- 45 PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, 2-Methyl-6-Phytylhydroquinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors werden und pSUN2-USPP-AthHPPDoc-sT und der Vektor pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynMT1-nosT miteinander kombiniert.

- 10 Das DNA Fragment bestehend aus LeB-Promotor, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPO-blunt/LeB-SynMT1-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AthHPPD-ocsT kloniert, dessen
- 15 XhoI Enden aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid pSUN2-USPP-AthHPPD-ocsT/LeB-SynMT1-nosT Abbildung 57) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

- 20 Fragment A (678Bp) in Abbildung 57 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminations-signal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenylpyrophosphat-Isomerase-2. Fragment F (957Bp) kodiert für das
- 25 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminations-signal des Nopalin-Synthase-Gens.

#### Beispiel 70

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranyl-pyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.
- 35
- 40

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, die Geranylgeranyl-pyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, und Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidop-*
- 45

sis thaliana samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT/USPP-AtHPT-ocsT und pCR4topoblunt-USPP-AtHPPD-ocsT miteinander kombiniert.

- 5 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz-1 wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-AtHPPD-ocsT als SrfI Fragment isoliert und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT/USPP-AtHPT-ocsT kloniert, nachdem die
- 10 XhoI Enden zuvor mit der Klenow Polymerase geglättet werden. Dieses Plasmid (pSUN2LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-AtHPPD-ocsT/USPP-AtHPT-ocsT Abbildung 58) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.
- 15 Fragment A (678Bp) in Abbildung 58 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet
- 20 den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment G (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia*
- 25 *faba*, Fragment H (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment I (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens:
- 30 Beispiel 71
- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors, der 2-Methyl-6-Phytylhydroquinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec*
- 35 PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
- 40 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors expri-
- 45 mieren und  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren,

werden die Konstrukte pSUN2-SBPP-AtyTMT35ST/USPP-AthPPD-ocsT/LeB-SynMT1-nosT und pCR4topoblunt/LeB-IPP-SynCyc-nosT verwendet.

Das DNA Fragment bestehend aus LeB-Promotor, 2,3-Dimethyl-5-Phy-  
 5 tylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis spec* PC6808 und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4topoblunt/LeB-IPP-SynCyc-nosT als EcoR5 Fragment isoliert und in den mit Srf1 verdauten Vektor pSUN2-SBPP-AtyTMT-35ST/USPP-AthPPD-ocsT/LeB-SynMT1-nosT kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym Srf1  
 10 verdaut wird. Dadurch wird die Expressionkassette bestehend aus USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvat-Dehydrogenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationsequenz gegen die Expressionkassette bestehend aus LeB-Promotor, die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol- Zyklase-Genaus *Synechocystis spec* PC6808 und nos-  
 15 Terminationsequenz, ausgetauscht.

Dieses Plasmid pSUN2-SBPP-AtyTMT35sT/LeB-IPP-SynCyc-nosT/LeB-IPP-SynMT1-nosT Abbildung 59) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

20 Fragment A (1788Bp) in Abbildung 59 beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (1047Bp) kodiert für das  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment C (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohlmosaikvi-  
 25 rus. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment F (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis sp.* PCC6803. Frag-  
 30 ment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase- Gens. Fragment H (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment I (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment J (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhy-  
 35 drochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis sp.* PCC6803. Fragment K (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

#### Beispiel 72

40 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-  
 45 gener *A.thaliana*, *Nicotiana tabacum* bzw. *B.napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* (Seq. ID. No. 1) unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren,

wurde ein Derivat des Vektors pGPTVkan (D.Becker, E. Kemper, J. Schell, R. Masterson. *Plant Molecular Biology* 20: 1195-1197, 1992) verwendet.

- 5 Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des Legumin B4 Gens (Kafatos et al., *Nuc. Acid. Res.*, 14(6):2707-2720, 1986), die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) (Badur, unveröffentlicht) und das
- 10 Terminationssignal der Nopalinsynthase aus *A.tumefaciens* (Depicker et al., *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 561-73, 1982) enthält.

- Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus* wurde als EcoR5 Fragment in den pPTVkan-
- 15 LeP-IPPTP11 kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym SalI verdaut und die Enden des linearisierten Plasmides mit dem Klenow Enzym in glatte Enden überführt wurden. Dadurch wurde eine Translationsfusion mit dem Transitpeptid der IPP-2 erzeugt und somit ein Import der Tyrosin-Aminotransferase in die Plastiden
- 20 gewährleistet. Dieses Plasmid pPTVkan-IPPTP11-TATaseRNnos (oder auch pPTVkan-LeB4-IPP-RnTATase-nosT bezeichnet, Abbildung 60) wurde zur Erzeugung transgener *Brassica Napus* bzw. *A. thaliana* Pflanzen verwendet.

- 25 Fragment A (2764 bp) in Abbildung 60 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (207bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1377 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) kodiert für
- 30 das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens.

### Beispiel 73

- Herstellung von Expressionskassetten enthaltend das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*
- 35

- Transgene *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden erzeugt, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* (Seq. ID. No. 1) unter Kontrolle des konstitutiven
- 40 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., *Cell* 21: 285-294, 1980) exprimieren.

- Die Grundlage des zur konstitutiven Expression der Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Rattus norvegicus* erzeugten Plasmides war der
- 45 pBinAR-IPP-Tp-10 (Ralf Badur, Dissertation Universität Göttingen, 1998). Dieser Vektor ist ein Derivat des pBinAR (Höfgen und Willmitzer, *Plant Sci.* 66: 221-230, 1990) und enthält den 35S-

- Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., 1980) das Terminations-signal des Octopin-Synthase Gens (Gielen et al., EMBO J. 3: 835-846, 1984) und die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) (Badur, unveröffentlicht). Die unter Berücksichtigung des korrekten Leserasters erfolgte Klonierung der Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* in diesen Vektor, erzeugt eine Translationsfusion der Tyrosin-Aminotransferase mit dem plastidären Transitpeptid. Dadurch erfolgt ein
- 10 Transport des Transgens in die Plastiden.
- Zur Erstellung dieses Plasmides wurde das Tyrosin-Aminotransferase-Gen unter Verwendung der flankierenden EcoRV Restriktionschnittstellen aus dem Plasmid pGEM-T/Tyrosin-Aminotransferase isoliert. Dieses Fragment wurde unter Anwendung von Standardmethoden in einen SmaI geschnittenen pBinAR-IPP-Tp-10 ligiert (siehe Abbildung 61) Dieses Plasmid pBinAR-IPP-Tp-10/Tyrosin-Aminotransferase (oder auch pBinAR-35sP-IPP-RnTATase-nost bezeichnet) wurde zur Erzeugung transgener *Nicotiana tabacum* und *A.thaliana* Pflanzen verwendet.
- 20
- Fragment A (529 bp) in Abbildung 61 beinhaltet den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Blumenkohlmosaikvirus), Fragment B (207bp) kodiert für das Transitpeptid der Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2, Fragment C (1377
- 25 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen-1 aus *Rattus norvegicus*, Fragment D (208Bp) kodiert für das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens.

#### Beispiel 74

- 30 Herstellung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

- Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Columbia) werden mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm (GV3101 [pMP90]) auf Grundlage einer modifizierten Vacuuminfiltrationsmethode transformiert
- 35 (Steve Clough und Andrew Bent. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *A.thaliana*. Plant J 16(6):735-43, 1998; der Bechtold, N. Ellis, J. und Pelletier, G., in: Planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. CR Acad Sci Paris, 1993,
- 40 1144(2):204-212). Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen werden im Vorfeld mit den vorstehend beschriebenen DNA Konstrukten transformiert.

- Samen der Primärtransformanten werden auf Grundlage der Antibiotikaresistenz selektioniert. Antibiotika resistente Keimlinge
- 45



## 116

wurden in Erde gepflanzt und als vollentwickelte Pflanzen zur biochemischen Analyse verwendet.

## Beispiel 75

5 Herstellung transgener *Nicotiana tabacum* Pflanzen.

Zehn ml YEB-Medium mit Antibiotikum (5 g/l Rinder-Extrakt, 1 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose und 2 mM  $MgSO_4$ .)

werden mit einer Kolonie von *Agrobacterium tumefaciens* beimpft

- 10 und über Nacht bei 28°C kultiviert. Die Zellen werden 20 min bei 4°C, 3500 U/min in einer Tischzentrifuge pelletiert und danach in frischem YEB-Medium ohne Antibiotika unter sterilen Bedingungen resuspendiert. Die Zellsuspension wird für die Transformation eingesetzt.

15

Die Wildtyp-Pflanzen aus Sterilkultur werden durch vegetative Replikation erhalten. Dazu wird nur die Spitze der Pflanze abgeschnitten und auf frisches 2MS-Medium in ein steriles Einweckglas überführt. Vom Rest der Pflanze werden die Haare auf der Blatto-

- 20 berseite und die Mittelrippen der Blätter entfernt. Die Blätter werden mit einer Rasierklinge in etwa 1cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten. Die Agrobakterienkultur wird in eine kleine Petrischale überführt (Durchmesser 2 cm). Die Blattstücke werden kurz durch diese Lösung gezogen und mit der Blattunterseite auf 2MS-Medium
- 25 in Petrischalen (Durchmesser 9 cm) gelegt, so daß sie das Medium berühren. Nach zwei Tagen im Dunkeln bei 25°C werden die Explantate auf Platten mit Kallusinduktionsmedium überführt und in der Klimakammer auf 28°C temperiert. Das Medium muß alle 7-10 Tage gewechselt werden. Sobald sich Kalli bilden, wurden die Explantate
- 30 in sterile Einweckgläser auf Sproßinduktionsmedium mit Claforan (0,6 % BiTec-Agar (g/v), 2,0 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Naphtyllessigsäure, 0,02 mg/l Gibberelinsäure, 0,25 g/ml Claforan, 1,6 % Glukose (g/v) und 50 mg/l Kanamycin) überführt. Nach etwa einem Monat tritt Organogenese ein und die gebildeten Sprosse können
- 35 abgeschnitten werden. Die Kultivierung der Sprosse wird auf 2MS-Medium mit Claforan und Selektionsmarker durchgeführt. Sobald sich ein kräftiger Wurzelballen bildet, können die Pflanzen in Pikiererde getopft werden.

40

## Beispiel 76

Herstellung transgener *Brassica napus* Pflanzen.

Die Herstellung transgener Raps Pflanzen orientiert sich an einem

- 45 Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual,

Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer angegeben ist.

Die Transformationen erfolgt mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 [pMP90]. Zur Transformation wird das DNA Konstrukt welches eine spezifische Expression in Samen vermittelt verwendet (Abbildung 60). Darüberhinaus werden Konstrukt welche eine spezifische Expression in Samen vermittelt verwendet, die in den Abbildungen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 beschrieben sind. Samen von *Brassica napus* var. Westar werden mit 70% Ethanol (v/v) oberflächensteril gemacht, 10 Minuten bei 55°C in Wasser gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 Minuten inkubiert und sechsmal mit sterilem Wasser für jeweils 20 Minuten gewaschen. Die Samen werden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glaskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) werden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explantate werden 30 Minuten mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einem 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallusinduktionsmedium werden die Kulturen für 24 Stunden bei 100 U/min inkubiert.

Vom *Agrobacterium* Stamm wird eine Übernachtskultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20mg/l) angesetzt, davon 2ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 Stunden bei 29°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wird das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wird durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 eingestellt.

Aus den Raps-Explanten wird das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml *Agrobacterium*-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die *Agrobacterien*-Suspension wird entfernt, die Raps-Explantate für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wird für 24 h auf einem Rotationschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wird durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min

gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wird in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

- Zur Regeneration werden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthalten. Die Petrischalen werden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25 °C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/ 8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage werden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium umgesetzt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen werden wie von Bade, J.B und Damm, B. (in: Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.
- 15 Beispiel 77
- a) Charakterisierung der transgenen *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* Pflanzen.

- Die Tocopherol- und Tocotrienol-Gehalte in Blätter und Samen der mit den beschriebenen Konstrukten transformierten Pflanzen (*Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*) werden analysiert. Dazu werden die transgenen Pflanzen im Gewächshaus kultiviert und Pflanzen die das Gen kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Rattus norvegicus* exprimieren auf Northern-Ebene analysiert.
- 25 In Blättern und Samen dieser Pflanzen wird der Tocopherolgehalt und der Tocotrienolgehalt ermittelt.

- Dazu wird das Blattmaterial von Pflanzen direkt nach der Probennahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Der daran anschließende Aufschluß der Zellen erfolgt mittels einer Rührapparatur durch dreimalige Inkubation im Eppendorfschüttler bei 30°C, 1000 rpm in 100 % Methanol für 15 Minuten, wobei die jeweils erhaltenen Überstände vereinigt wurden.
- 35 Weitere Inkubationsschritte ergaben keine weitere Freisetzung von Tocopherolen oder Tocotrienolen.

- Um Oxidation zu vermeiden, wurden die erhaltenen Extrakte direkt nach der Extraktion mit Hilfe einer HPLC-Anlage (Waters Alliance 2690) analysiert. Tocopherole und Tocotrienole wurden über eine reverse Phase Säule (ProntoSil 200-3-C30<sup>(R)</sup>, Fa. Bischoff) mit einer mobilen Phase von 100 % Methanol getrennt und anhand von Standards (Fa. Merck) identifiziert. Als Detektionssystem diente die Fluoreszenz der Substanzen (Anregung 295 nm, Emission 320 nm)
- 45 die mit Hilfe eines Jasco Fluoreszenzdetektors FP 920 nachgewiesen wurde.

In allen Fällen war die Tocopherol- und oder Tocotrienol-Konzentration in transgenen Pflanzen, im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen erhöht.

5 b) Charakterisierung der transgenen *Brassica napus* Pflanzen.

Um zu veranschaulichen, daß durch die Expression des Tyrosin-Aminotransferase-Gens aus *Rattus norvegicus*, Tyrosin-Aminotransferase-Gens 1 aus *Arabidopsis thaliana*, Tyrosin-Aminotransferase-  
10 Gens 3 aus *Arabidopsis thaliana*, Tyrosin-Aminotransferase-Gens 5 aus *Arabidopsis thaliana* oder Tyrosin-Aminotransferase-Gens 6 aus *Arabidopsis thaliana* alleine oder in Kombination mit zumindest einem weiteren Gen ausgewählt aus der Gruppe Hydroxyphenyl-Pyruvat-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Homogentisinsäure-  
15 Phytyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Geranylgeranylpyrophosphat-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum*, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803, 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase-Gen *Synechocystis* sp. PCC6803,  $\gamma$ -Tocopherol-methyltransferase-Gen aus  
20 *Arabidopsis thaliana* und der Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens, der Vitamin E-gehalt in Pflanzen erhöht wird, werden die Tocopherol- und Tocotrienol-Gehalte in den Samen der mit den beschriebenen Konstrukten transformierten Pflanzen (*Brassica napus*) analysiert.

25

Dazu werden die transgenen Pflanzen im Gewächshaus kultiviert und auf Northern-Ebene analysiert. In Samen dieser Pflanzen wird der Tocopherolgehalt und der Tocotrienolgehalt analog Beispiel 77 a) ermittelt.

30

Beispiel 78

Herstellung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, die die Tyrosinaminotransferase überexprimieren

35 Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Columbia) wurden mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm (GV3101 [pMP90]) auf Grundlage einer modifizierten Vakuuminfiltrationsmethode transformiert (Steve Clough und Andrew Bent. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *A.thaliana*. Plant J  
40 16(6):735-43, 1998; der Bechtold, N. Ellis, J. und Pelltier, G., in: Planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. CR Acad Sci Paris, 1993, 1144(2):204-212).

45 Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen waren im Vorfeld mit den Plasmiden pBinAR-35s-IPP-RnTatase-nosT (Beispiel 73, Abbildung 61) und pPTVkan-LeB4-IPP-RnTATase-nosT (Beispiel 72, Ab-

bildung 60) gemäß der von R. HÖFGEN und L. WILLMITZER (Plant Sci. 1990, 66, 221-230 und Nucleic Acids Res. 1988, Oct 25, 16(20), 9877) beschriebenen Methode transformiert worden.

- 5 Samen der Primärtransformanten wurden auf Grundlage der Antibiotikaresistenz selektioniert. Antibiotika resistente Keimlinge wurden in Erde gepflanzt und als vollentwickelte Pflanzen zur biochemischen Analyse verwendet.

#### 10 Beispiel 79

Herstellung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosinaminotransferase überexprimieren

- Die Herstellung transgener Raps Pflanzen orientierte sich an
- 15 einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer angegeben ist.
- 20 Die Transformationen erfolgten mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 [pMP90]. Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen waren im Vorfeld mit dem Plasmid pPTVkan-LeB4-IPP-RnTA-Tase-nost (Beispiel 72, Abbildung 60) gemäß der von R. HÖFGEN und L. WILLMITZER (Plant Sci. 1990, 66, 221-230 und Nucleic Acids
- 25 Res. 1988, Oct 25, 16(20), 9877) beschriebenen Methode transformiert worden.

- Samen von *Brassica napus* var. Westar wurden mit 70% Ethanol (v/v) oberflächensteril gemacht, 10 Minuten bei 55°C in Wasser ge-
- 30 waschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25 % v/v Teepol, 0,1 % v/v Tween 20) für 20 Minuten inkubiert und sechsmal mit sterilem Wasser für jeweils 20 Minuten gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glaskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von
- 35 mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explantate wurden 30 Minuten mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einem 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallusinduktions-
- 40 medium wurden die Kulturen für 24 Stunden bei 100 U/min inkubiert.

- Vom *Agrobacterium* Stamm wurde eine Übernachtskultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20mg/l) angesetzt, davon 2ml in
- 45 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 Stunden bei 29°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml

Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 eingestellt.

- 5 Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobakterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobakterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explantate für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend
- 10 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Wasch-
- 15 medium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

- Zur Regeneration wurden jeweils 20 bis 30 Explante in 90 mm
- 20 Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit
- 25 Sproß-Induktionsmedium umgesetzt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurden wie von Bade, J.B und Damm, B. (in: Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

30

Beispiel 80

Herstellung transgener *Nicotiana tabacum* Pflanzen, die die Tyrosinaminotransferase überexprimieren

- 35 Zehn ml YEB-Medium mit Antibiotikum (5 g/l Rinder-Extrakt, 1 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose und 2 mM MgSO<sub>4</sub>.) wurden mit einer Kolonie von *Agrobacterium tumefaciens* beimpft und über Nacht bei 28°C kultiviert. Die Zellen wurden 20 min bei 4°C, 3500 U/min in einer Tischzentrifuge pelletiert und danach in
- 40 frischem YEB-Medium ohne Antibiotika unter sterilen Bedingungen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für die Transformation eingesetzt.

- Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen waren im Vorfeld
- 45 mit dem Plasmid pBinAR-35s-IPP-RnTatase-nost (Beispiel 73, Abbildung 61) gemäß der von R. HÖFGEN und L. WILLMITZER (Plant Sci.

1990, 66, 221-230 und Nucleic Acids Res. 1988, Oct 25, 16(20), 9877) beschriebenen Methode transformiert worden.

Die Wildtyp-Pflanzen aus Sterilkultur wurden durch vegetative  
5 Replikation erhalten. Dazu wurde nur die Spitze der Pflanze abgeschnitten und auf frisches 2MS-Medium in ein steriles Einweckglas überführt. Vom Rest der Pflanze wurden die Haare auf der Blattoberseite und die Mittelrippen der Blätter entfernt. Die Blätter wurden mit einer Rasierklinge in etwa 1cm<sup>2</sup> große Stücke  
10 geschnitten. Die Agrobakterienkultur wurde in eine kleine Petrischale überführt (Durchmesser 2 cm). Die Blattstücke wurden kurz durch diese Lösung gezogen und mit der Blattunterseite auf 2MS-Medium in Petrischalen (Durchmesser 9 cm) gelegt, so daß sie das Medium berührten.

15

Nach zwei Tagen im Dunkeln bei 25°C wurden die Explantate auf Platten mit Kallusinduktionsmedium überführt und in der Klimakammer auf 28°C temperiert. Das Medium mußte alle 7 bis 10 Tage gewechselt werden. Sobald sich Kalli bildeten, wurden die  
20 Explantate in sterile Einweckgläser auf Sproßinduktionsmedium mit Claforan (0,6 % BiTec-Agar (g/v), 2,0 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Naphthylelessigsäure, 0,02 mg/l Gibberelinsäure, 0,25 g/ml Claforan, 1,6 % Glukose (g/v) und 50 mg/l Kanamycin) überführt. Nach etwa einem Monat trat Organogenese ein und die  
25 gebildeten Sprosse konnten abgeschnitten werden.

Die Kultivierung der Sprosse wurde auf 2MS-Medium mit Claforan und Selektionsmarker durchgeführt. Sobald sich ein kräftiger Wurzelballen gebildet hatte, konnten die Pflanzen in Pikiererde  
30 getopft werden.

#### Beispiel 81

Charakterisierung der transgenen Pflanzen aus Beispiel 78, 79 und 80

35

Die Tocopherol- und Tocotrienol-Gehalte in Blätter und Samen der mit den beschriebenen Konstrukten transformierten Pflanzen aus Beispiel 78, 79 und 80 (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* und *Nicotiana tabacum*) werden analysiert. Dazu wurden die transgenen  
40 Pflanzen im Gewächshaus kultiviert und Pflanzen die das Gen kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* exprimieren auf Northern-Ebene analysiert. In Blättern und Samen dieser Pflanzen wurde der Tocopherolgehalt und der Tocotrienolgehalt ermittelt.

45

Dazu wird das Blattmaterial von Pflanzen direkt nach der Probenahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Der daran anschließende Aufschluß der Zellen erfolgt mittels einer Rührapparat-  
 5 30°C, 1000 rpm in 100 % Methanol für 15 Minuten, wobei die jeweils erhaltenen Überstände vereinigt wurden.

Weitere Inkubationsschritte ergaben keine weitere Freisetzung von Tocopherolen oder Tocotrienolen.

10

Um Oxidation zu vermeiden, wurden die erhaltenen Extrakte direkt nach der Extraktion mit Hilfe einer HPLC-Anlage (Waters Alliance 2690) analysiert. Tocopherole und Tocotrienole wurden über eine reverse Phase Säule (ProntoSil 200-3-C30<sup>(R)</sup>, Fa. Bischoff) mit ei-  
 15 ner mobilen Phase von 100 % Methanol getrennt und anhand von Standards (Fa. Merck) identifiziert. Als Detektionssystem diente die Fluoreszenz der Substanzen (Anregung 295 nm, Emission 320 nm) die mit Hilfe eines Jasco Fluoreszenzdetektors FP 920 nachgewiesen wurde.

20

Tabelle 1 zeigt das Ergebnis der Überexpression der Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* in 16 Linien (Linie 1 bis 24) der transgenen *Nicotiana tabacum*, hergestellt nach Beispiel 80 im Vergleich zum Wildtyp (WT, 4 Replikanten). Dargestellt in der  
 25 zweiten Spalte ist der Gehalt an Vitamin E (Gesamtgehalt = Summe aller 8 Isomere) in jungem Blattmaterial in [ $\mu\text{g/gFW}$ ]. In der dritten Spalte ist der Tocotrienol-Anteil der jeweiligen Linie am Gesamtgehalt Vitamin E in [Gew.-%] angegeben.

30 Tabelle 1

	Linie transgener <i>Nicotiana tabacum</i> - Pflanzen aus Beispiel 80	Gesamtgehalt Vitamin E in [ $\mu\text{g/gFW}$ ]	Anteil Tocotrienole in [Gew.-%] bezogen auf den Gesamtgehalt
35	1	9,13	48,5
	2	2,95	4,6
	3	5,94	49,5
	4	7,24	5,8
	6	5,97	7,6
40	7	8,02	6,4
	9	16,26	53,1
	10	8,95	41,3
	11	13,28	51,6
	16	8,96	42,9
	17	3,99	3,2
45	18	10,58	51,7
	19	7,57	41,3
	24	14,76	56,7
	WT n=4	5,4 +/- 0,5	4,75 +/- 2,4



## 124

Abbildung 63 zeigt grafisch das Ergebnis der Überexpression der Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* in *Nicotiana tabacum* (Beispiel 80) im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt sind die Gehalte an Vitamin E (Summe aller 8 Isomere) in jungem 5 Blattmaterial. Die Achsenbeschriftung kennzeichnet die einzelnen transgenen Linien. Die dargestellten Werte bei den Wildtyp-pflanzen (wt) entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SD von 4 Replikaten.

10

15

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung  
5 von Organismen die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität aufweisen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Tyrosinaminotransferase gegenüber dem Wildtyp erhöht.  
10
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase, in den Organismus einbringt.  
15
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische Eigenschaft einer Tyrosinaminotransferase aufweisen.  
20
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 einbringt.  
25
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, Tocopherolcyclase-Aktivität und  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität aufweisen.  
30  
35
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren  
40  
45

kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase gegenüber dem Wildtyp erhöht.

- 5 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression mindestens einer der Nukleinsäuren, mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phy-  
10 tyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase in den Organismus ein-  
15 bringt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität, Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität und Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität aufweisen.
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man zur zusätzlichen Reduzierung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Maleylacetoacetat-Isomerase und Nukleinsäuren kodierend eine Fumarylacetoacetat-Hydrolase gegenüber dem Wildtyp reduziert.
- 25 30 11. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen.
- 35 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man in den Organismus eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil der Organismus eigenen Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxy-  
40 genase identisch ist.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus eine Pflanze verwendet.
- 45

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man nach dem Kultivieren den Organismus erntet und die Vitamin-E-Verbindungen anschließend aus dem Organismus isoliert.
- 5
15. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.
- 10
16. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren enthalten, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.
- 15
17. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 15 oder 16 dadurch gekennzeichnet, daß man als Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase ein Nukleinsäuren verwendet, die Proteine kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- 20
- eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische Eigenschaft einer Tyrosinaminotransferase aufweist.
- 25
18. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man Regulationssignale verwendet, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.
- 30
19. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 18, enthaltend zusätzlich eine Nukleinsäure kodierend ein plastidäres Transitpeptid.
- 35
20. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 15 bis 19, enthaltend zusätzlich eine, zwei oder drei Nukleinsäuren, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren
- 40
- kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die
- 45
- Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

21. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 15 bis 20,  
enthaltend zusätzlich funktionell verknüpft eine RNA, die ei-  
nen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem  
Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil  
5 einer Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxygenase  
identisch ist.
22. Kombination aus Nukleinsäurekonstrukten, wobei die Kombina-  
tion ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß einem der Ansprüche 15  
10 bis 21 und
- a) mindestens ein weiteres Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt  
aus der Gruppe A bis F
- 15 A Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend  
eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, die mit einem oder  
mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind,  
die die Transkription und Translation in Organismen ge-  
währleisten,
- 20 B Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend  
eine Homogentisat-Phytyltransferase, die mit einem oder  
mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind,  
die die Transkription und Translation in Organismen ge-  
25 währleisten und
- C Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend  
eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, die mit  
einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell ver-  
knüpft sind, die die Transkription und Translation in Or-  
30 ganismen gewährleisten,
- D Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend  
eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, die  
mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell  
35 verknüpft sind, die die Transkription und Translation in  
Organismen gewährleisten,
- E Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend  
eine Tocopherolcyclase, die mit einem oder mehreren  
Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die  
40 Transkription und Translation in Organismen gewährleisten  
und
- 45 F Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend  
eine  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase, die mit einem oder  
mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind,

die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

oder

5

b) mindestens ein weiteres Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend zwei, drei oder vier Nukleinsäurekonstrukte, ausgewählt aus der Gruppe der Nukleinsäurekonstrukte A bis F,

10

umfasst.

23. Kombination von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren und einen oder mehrere Terminatoren enthalten, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

15

24. Kombination von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß man Regulationssignale verwendet, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

20

25. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Tyrosinaminotransferase gegenüber einem Wildtyp erhöht.

25

26. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.

30

27. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase, in den Organismus einbringt.

35

28. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische Eigenschaft einer Tyrosinaminotransferase aufweisen.

40

45

29. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus mindestens eine exogene Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase enthält.
30. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, Tocopherolcyclase-Aktivität und  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität gegenüber einem Wildtyp erhöht.
31. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten durch eine Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
32. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine Tocopherolcyclase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase oder

zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase, enthält.

33. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25  
5 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe, Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität, Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität und Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität gegenüber einem Wildtyp reduziert.
- 10 34. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Reduzierung mindestens einer der Aktivitäten durch eine Reduzierung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren  
15 kodierend eine Homogentisat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Maleylacetoacetat-Isomerase und Nukleinsäuren kodierend eine Fumarylacetoacetat-Hydrolase, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
- 20 35. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß der genetisch veränderte Organismus gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Vitamin E-Gehalt aufweist.
- 25 36. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 35, dadurch gekennzeichnet daß man als Organismus eine Pflanze verwendet.
- 30 37. Verwendung eines genetisch veränderten Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 36 zur Herstellung von Vitamin E.
38. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 als Futter- und Nahrungsmittel, zur Herstellung von prozessierten Lebensmittel, zur Herstellung  
35 von Vitamin E-haltigen Extrakten der Organismen oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmittel.
39. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen gemäß einem der Ansprüche 25 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12  
40 oder Nukleinsäurekonstrukte gemäß einem der Ansprüche 15 bis 21 oder Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24 in das Genom des Ausgangsorganismus einführt.
- 45



## 132

40. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 oder der Nukleinsäurekonstrukte gemäß einem der Ansprüche 15 bis 21 oder der Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24 zur Erhöhung des Gehalts an Vitamin E in Organismen, die als Wildtyp in der Lage sind, Vitamin E zu produzieren.

10

15

20

25

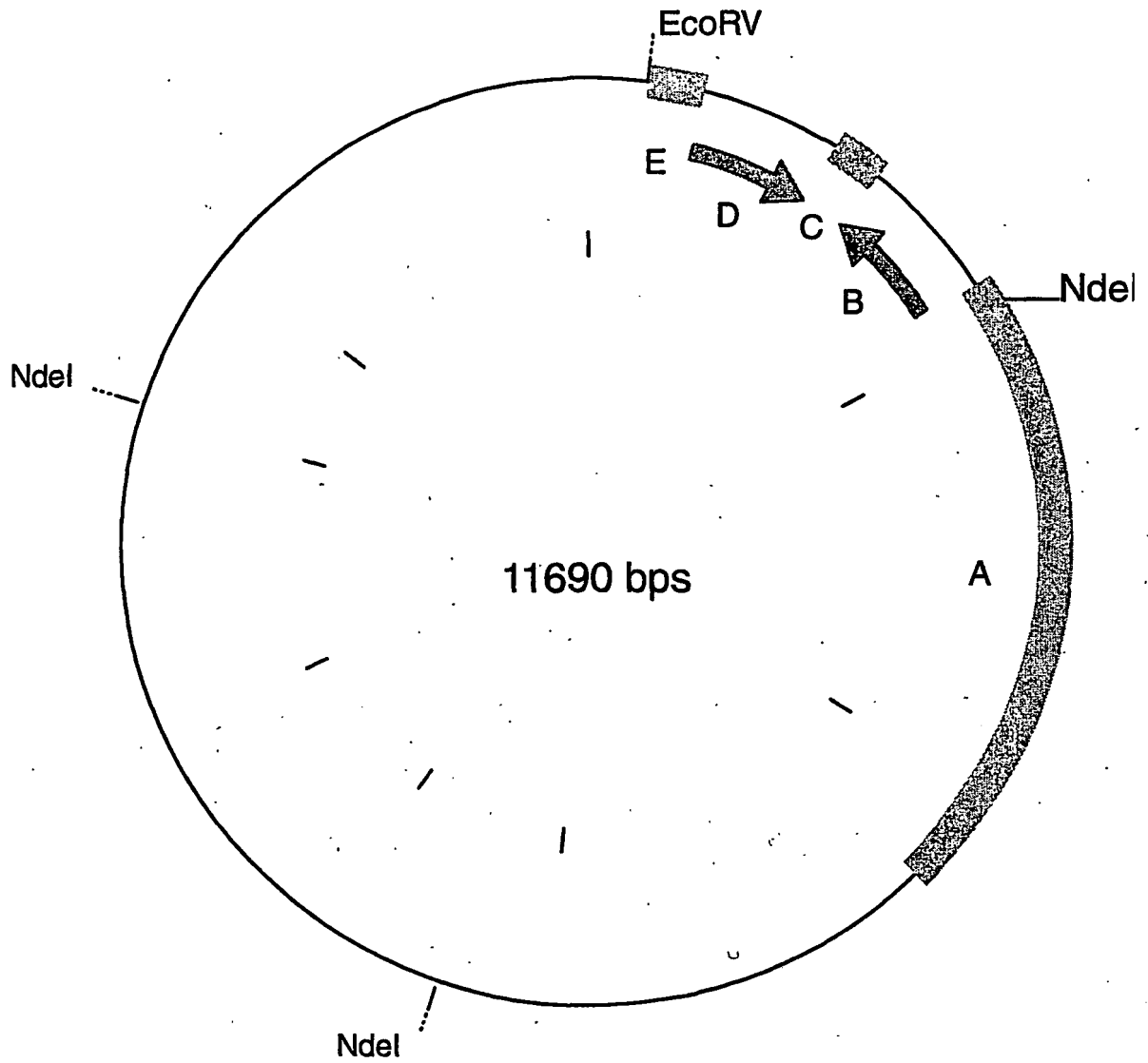
30

35

40

45

Abbildung 1:

**pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocst**

## Abbildung 2:

pSUN2-USPP-rbcS-RnTATase-nost

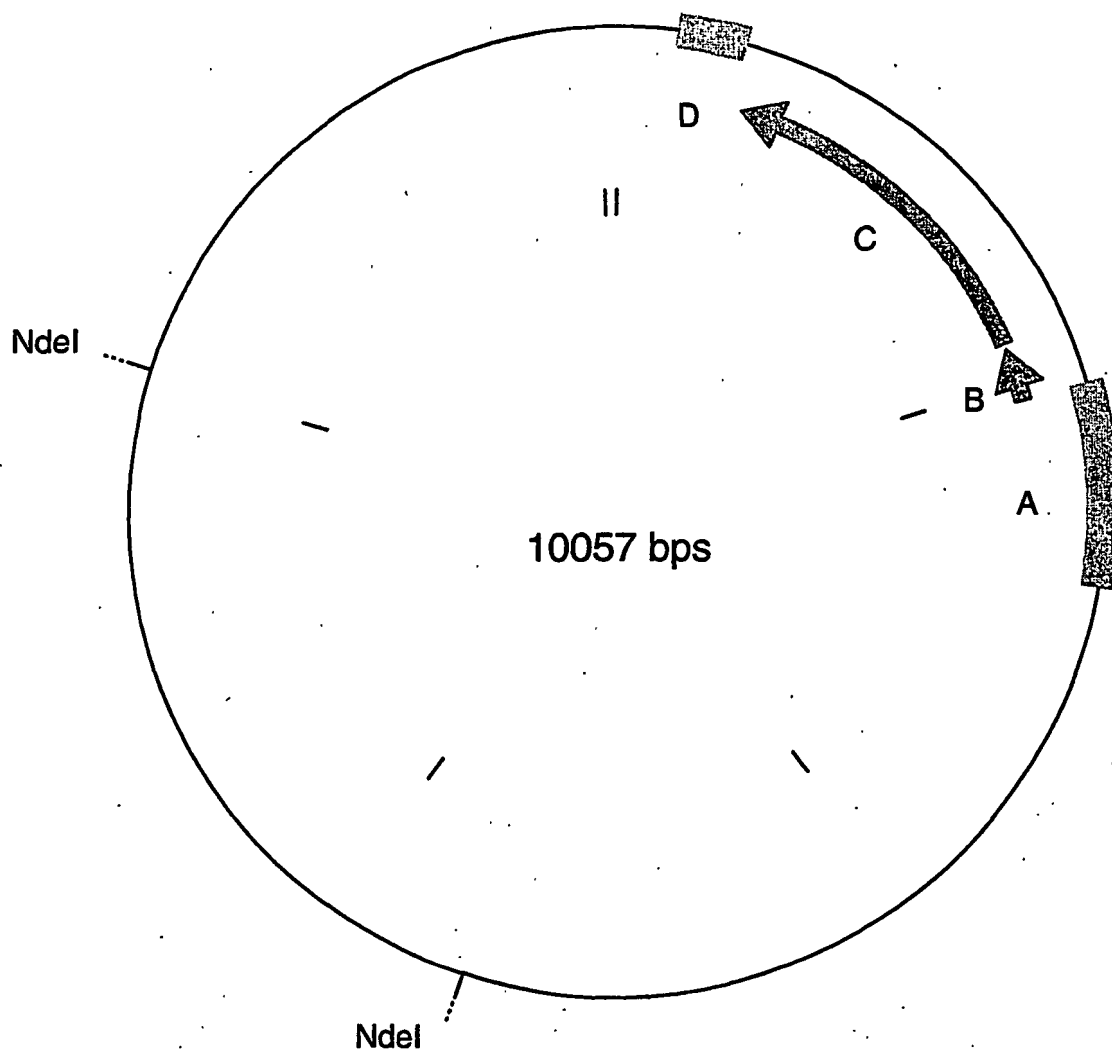


Abbildung 3:

pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT

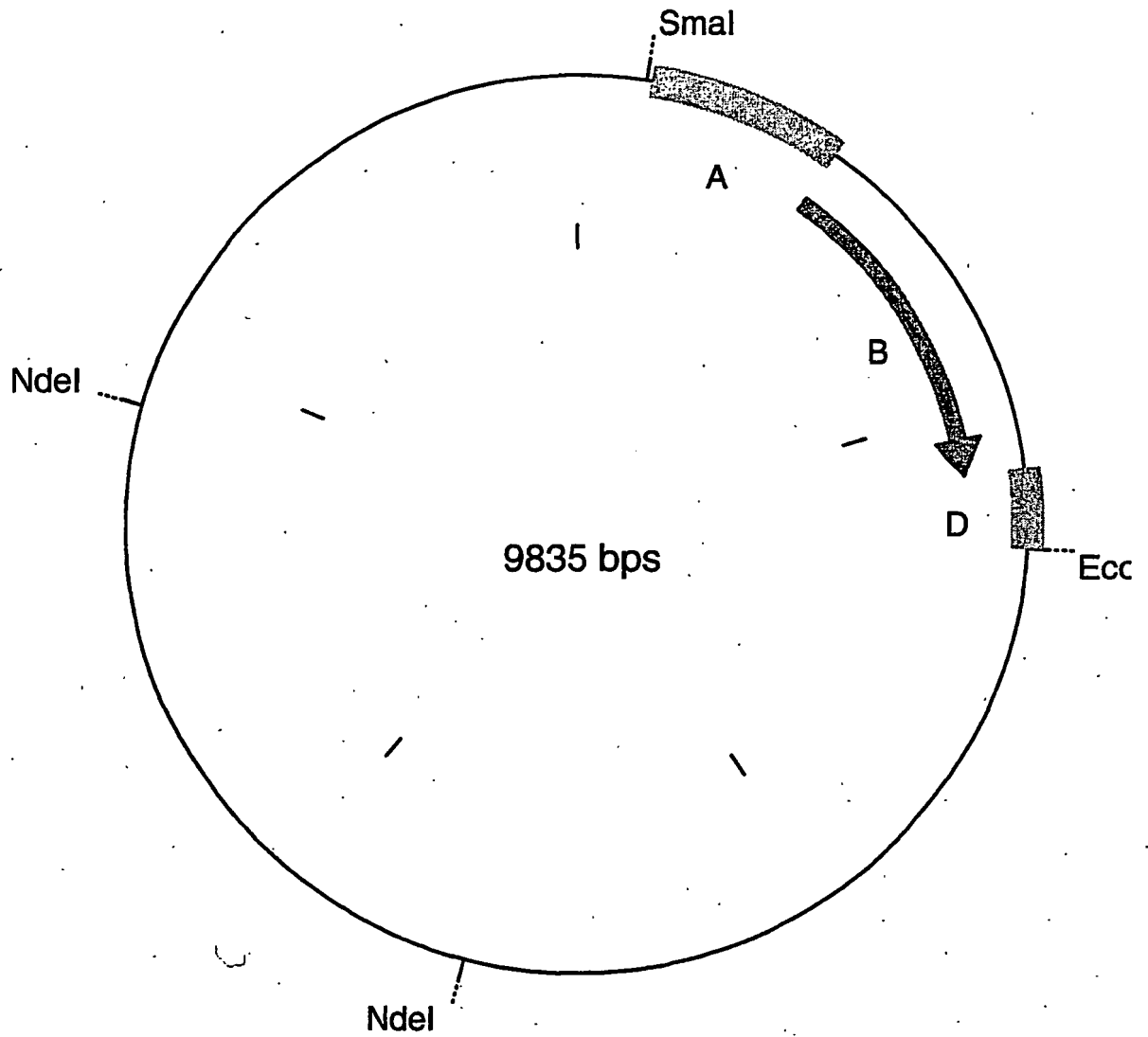


Abbildung 4:

pSUN2-USPP-AtTATase3-nost

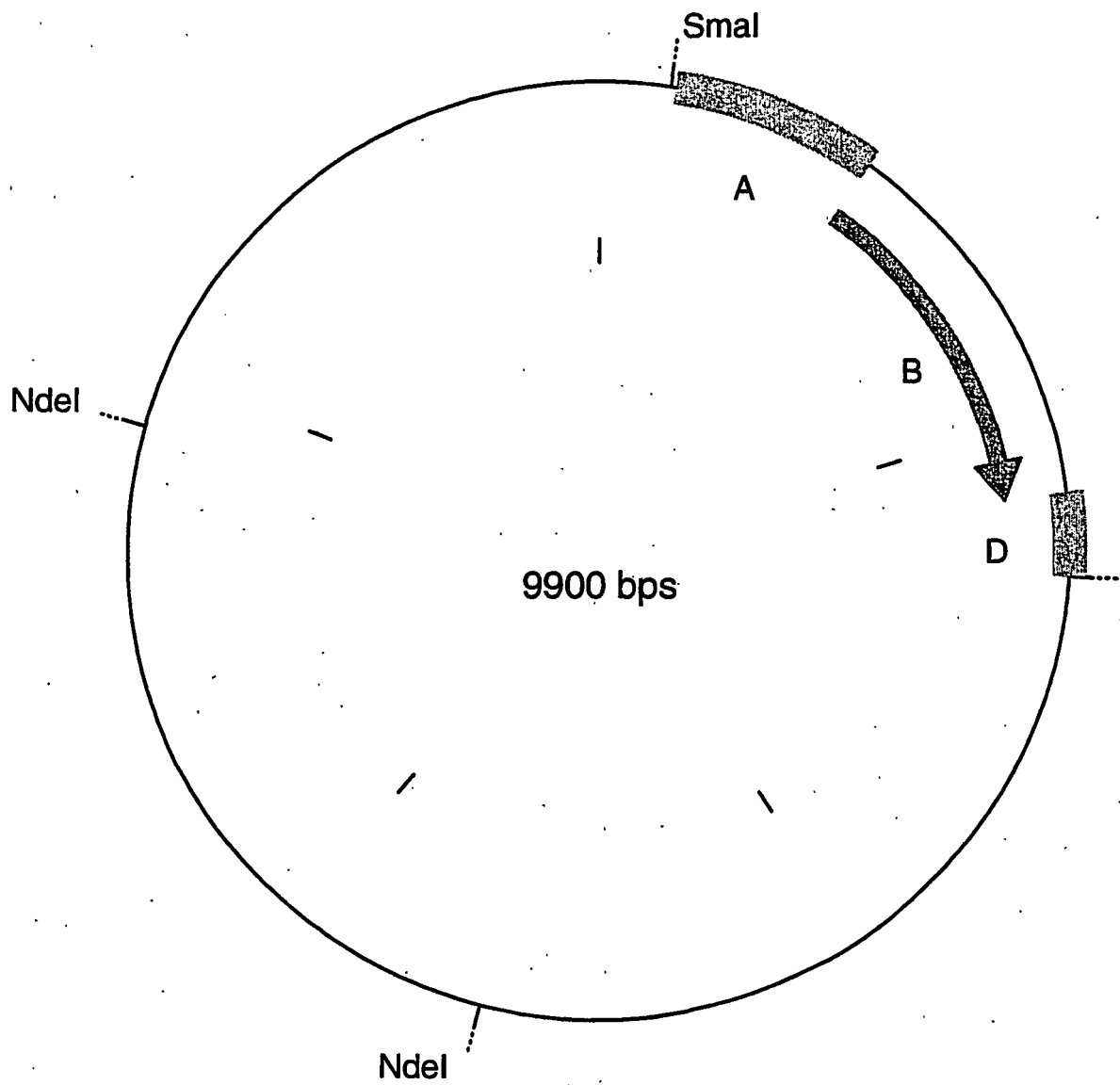


Abbildung 5:

pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT

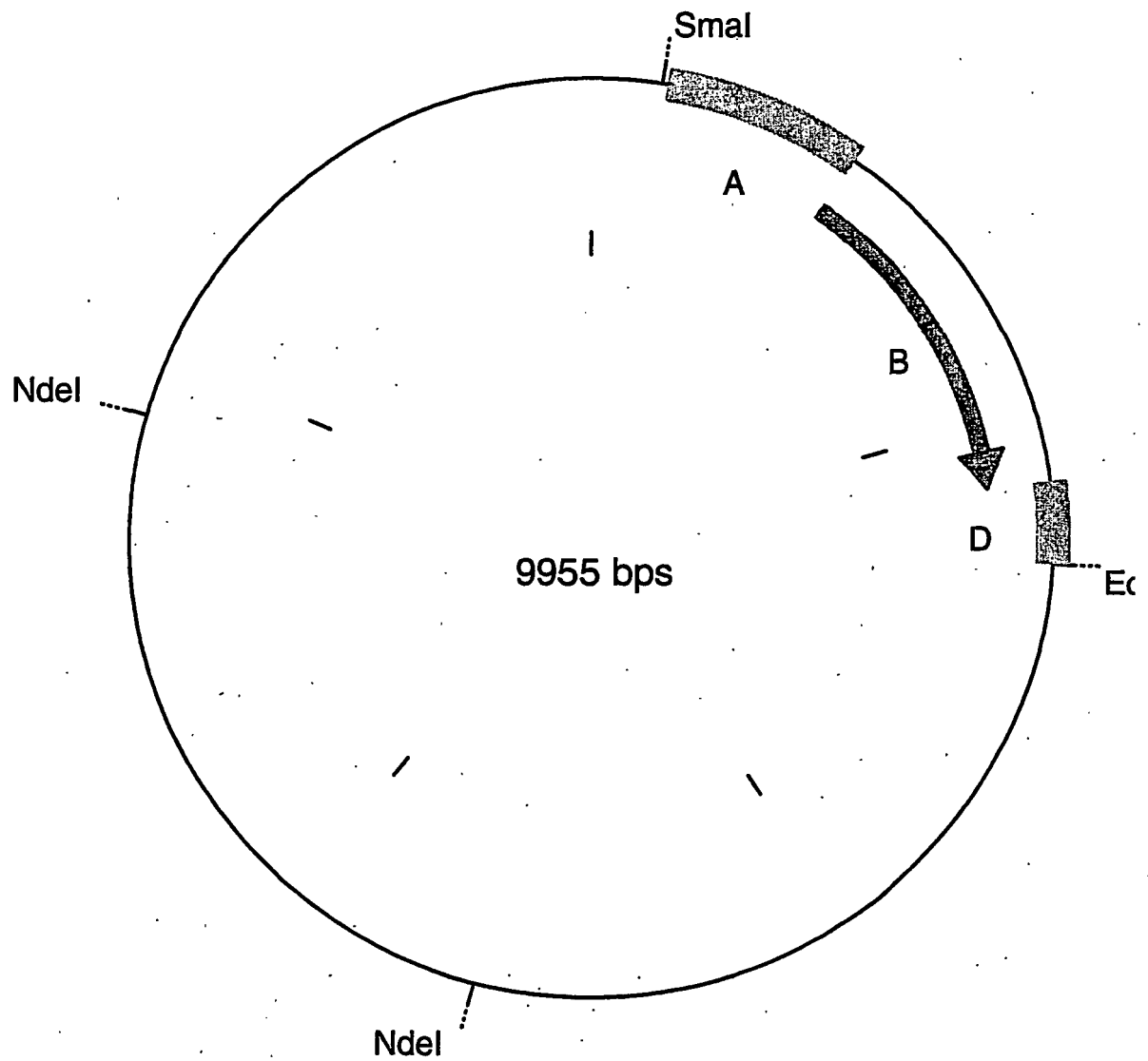
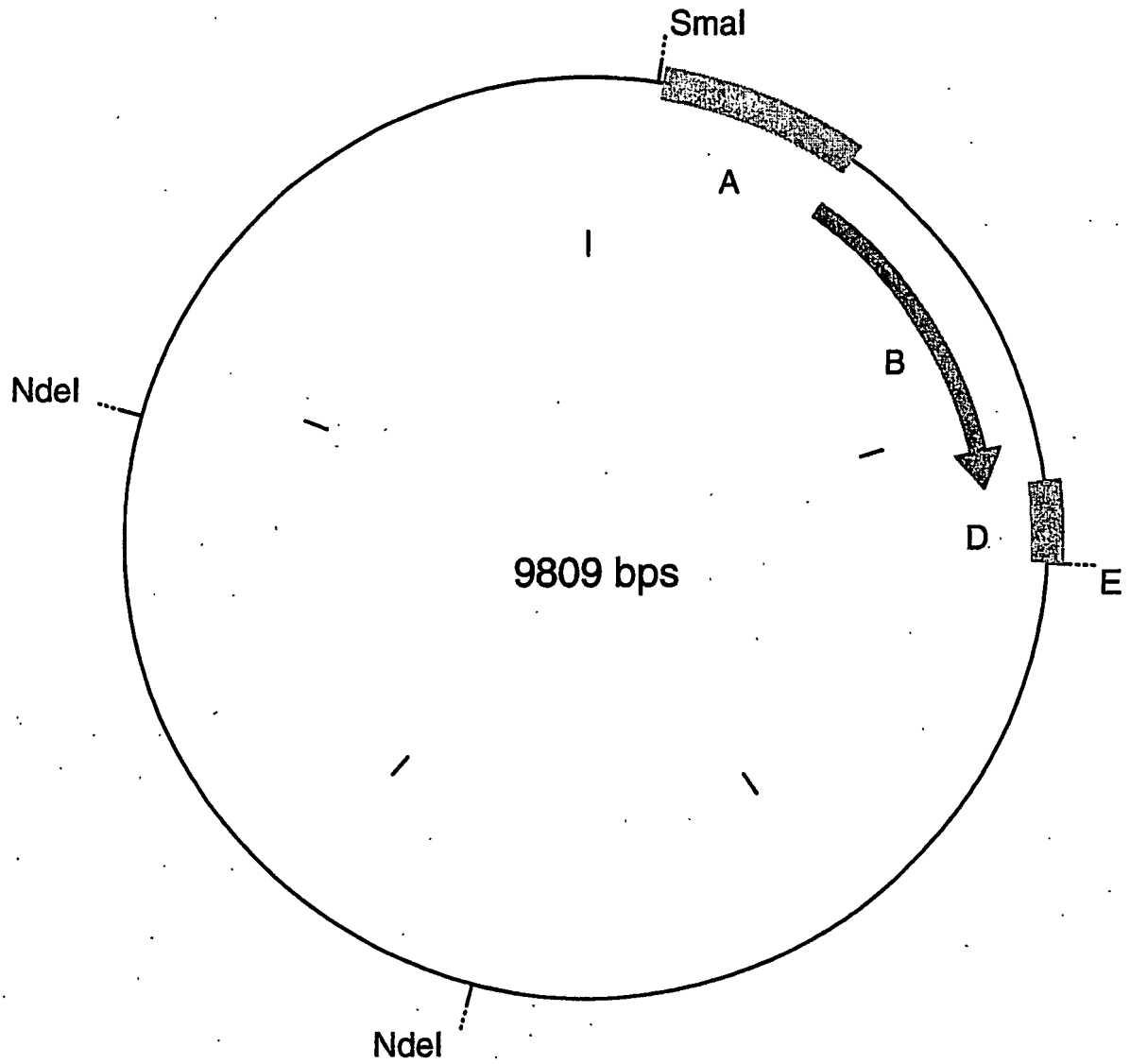


Abbildung 6:

pSUN2-USPP-AtTATase6-nost



7/63

Abbildung 7:

pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT

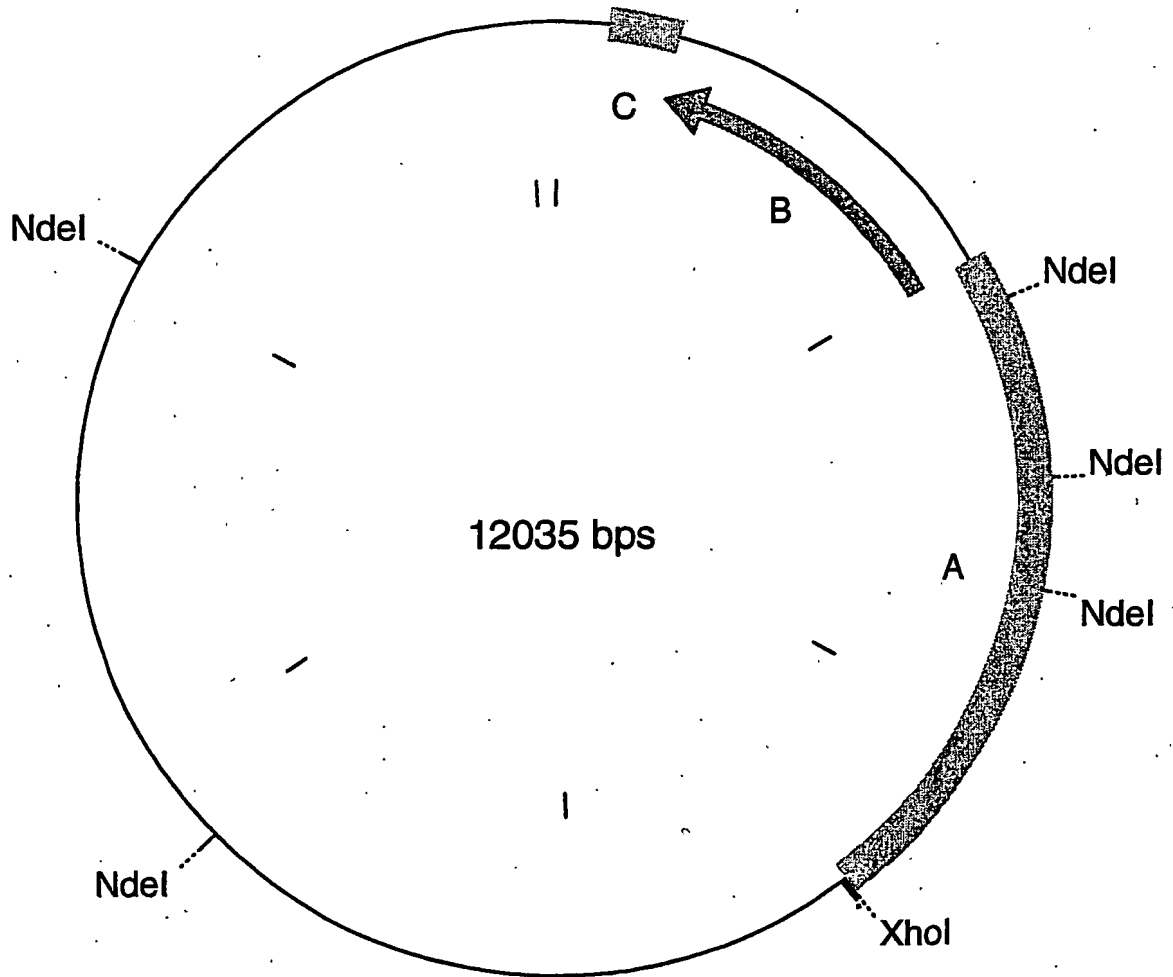
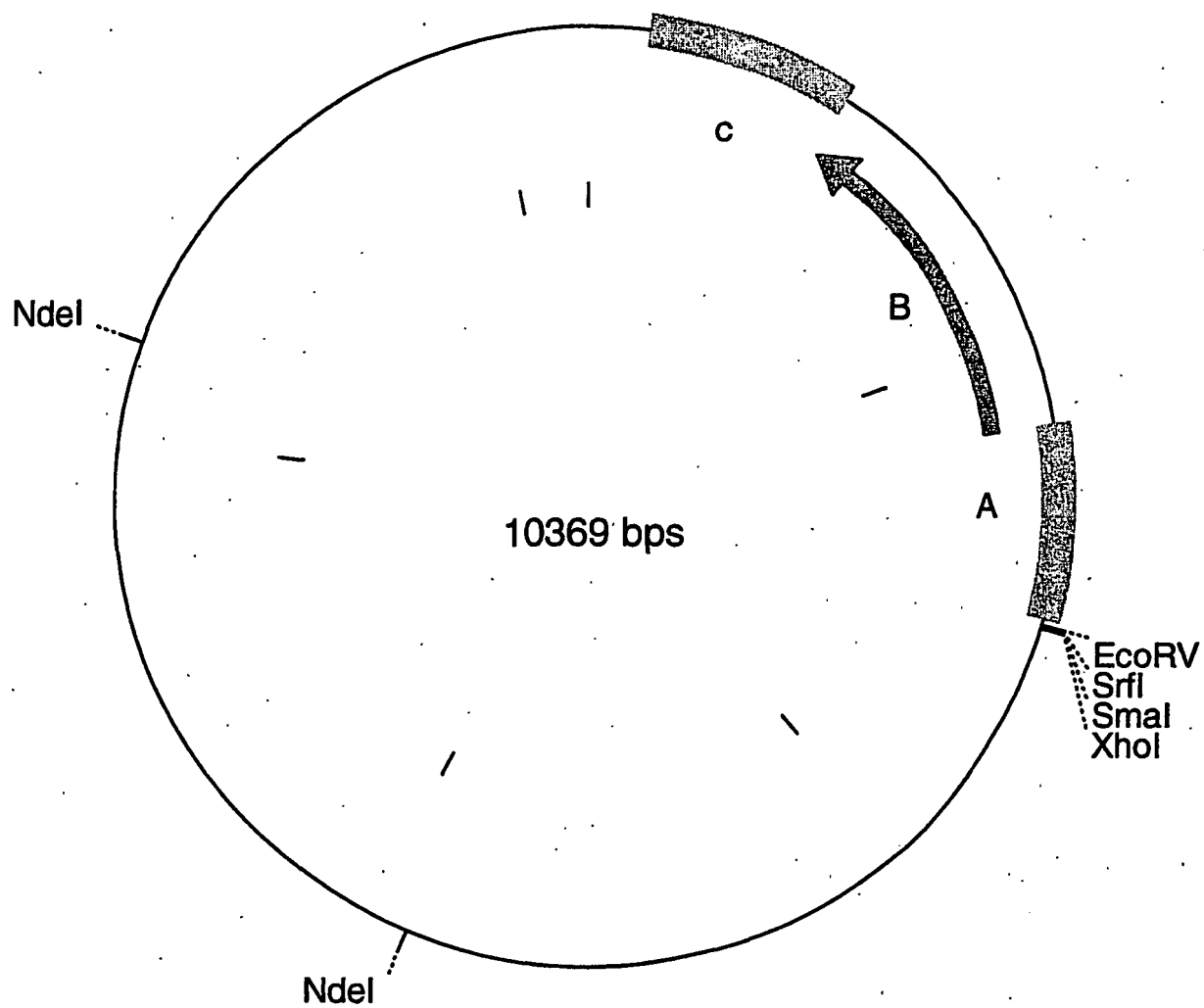




Abbildung 8:

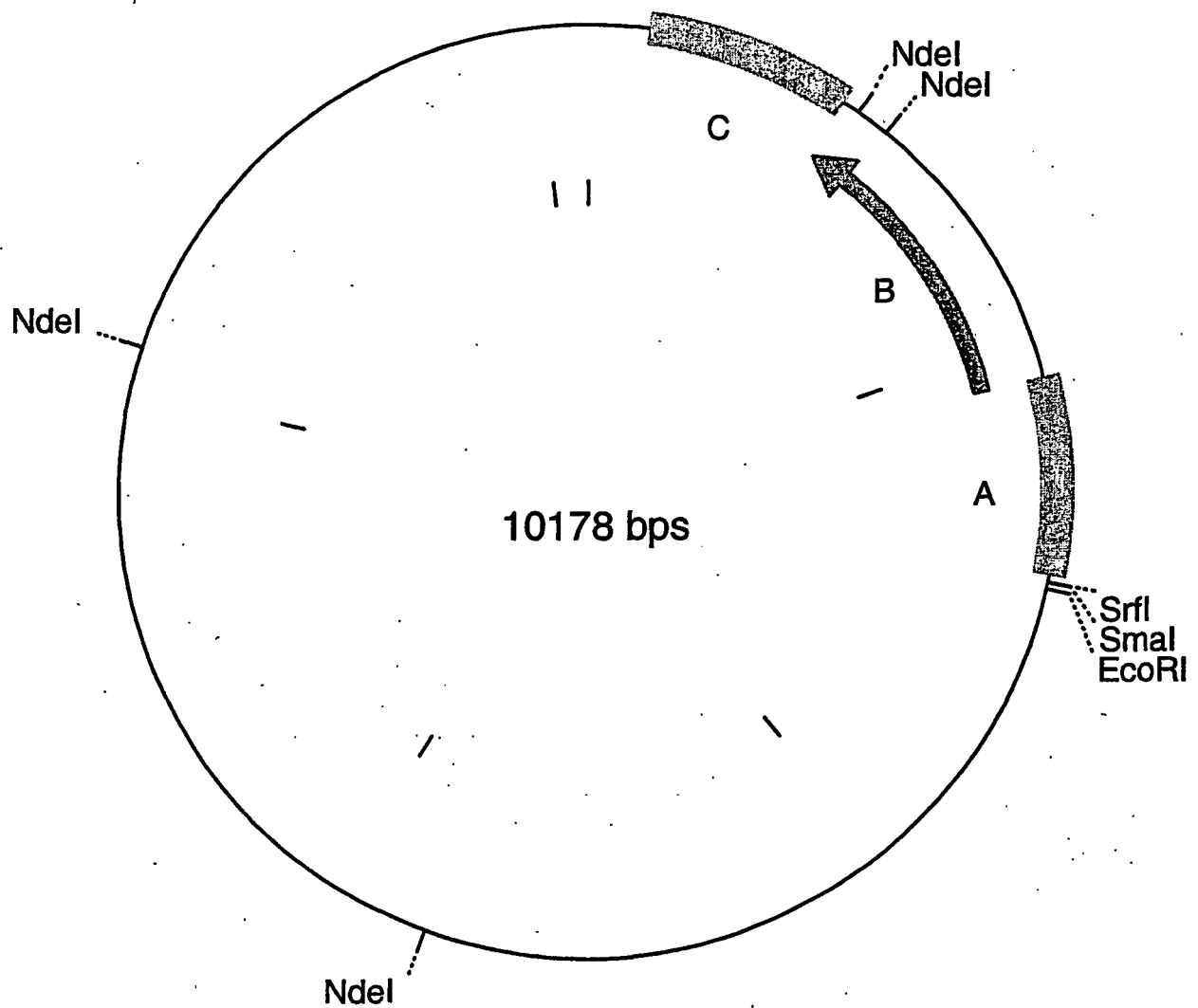
pSUN2-USP-AthHPPD-ocsT



9/63

Abbildung 9:

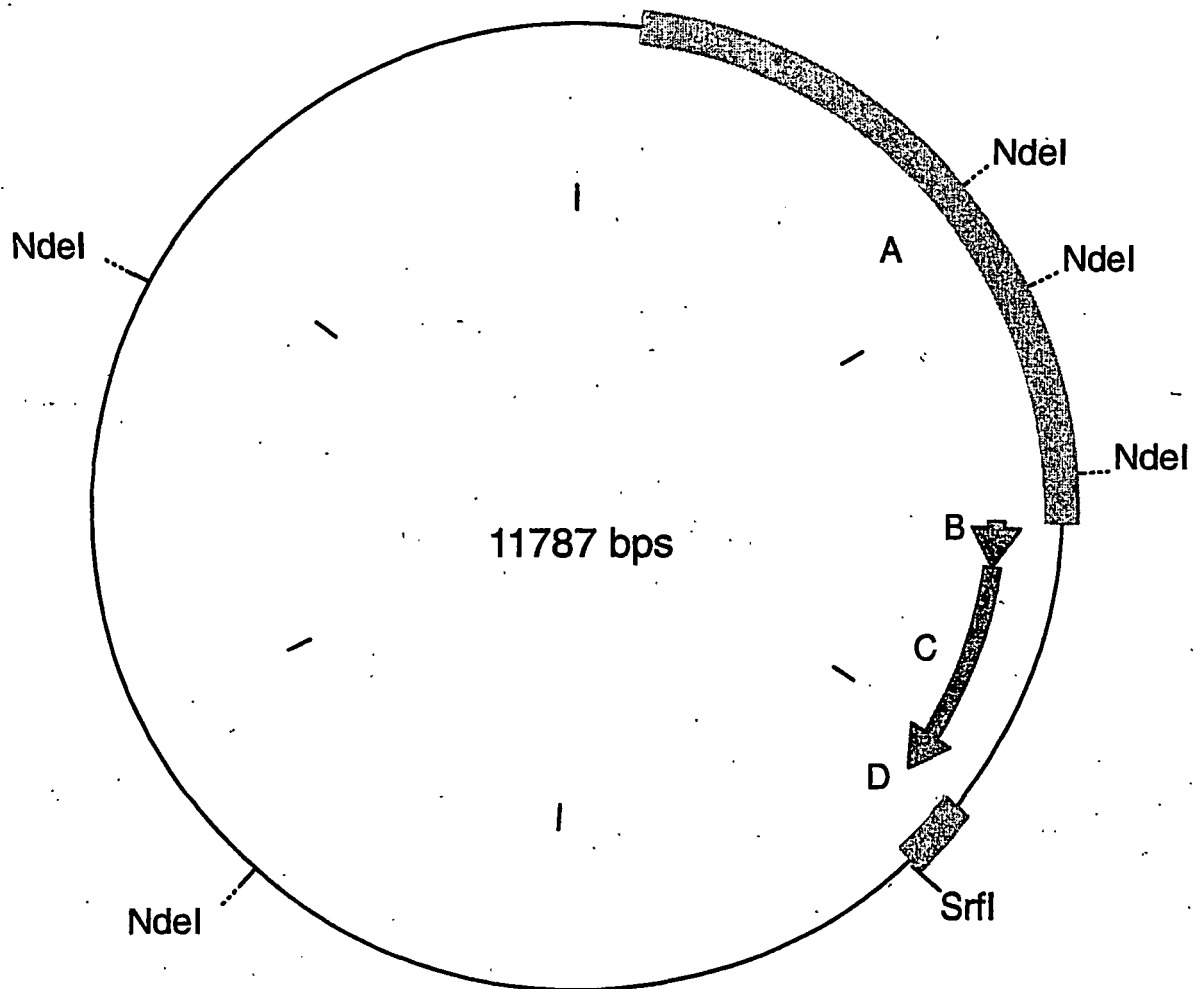
pSUN2-USP-AthPT-ocst



10/63

Abbildung 10:

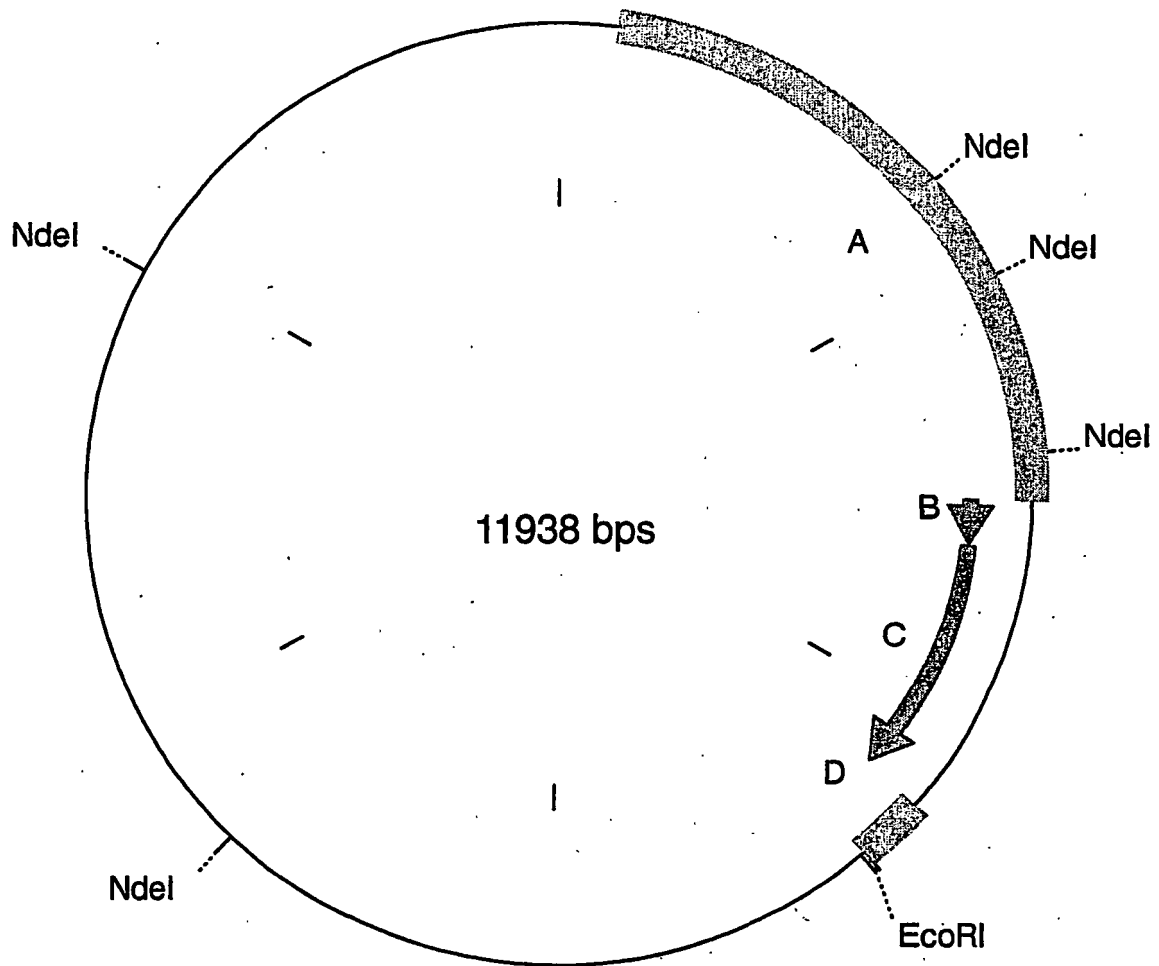
pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nost



11/63

Abbildung 11:

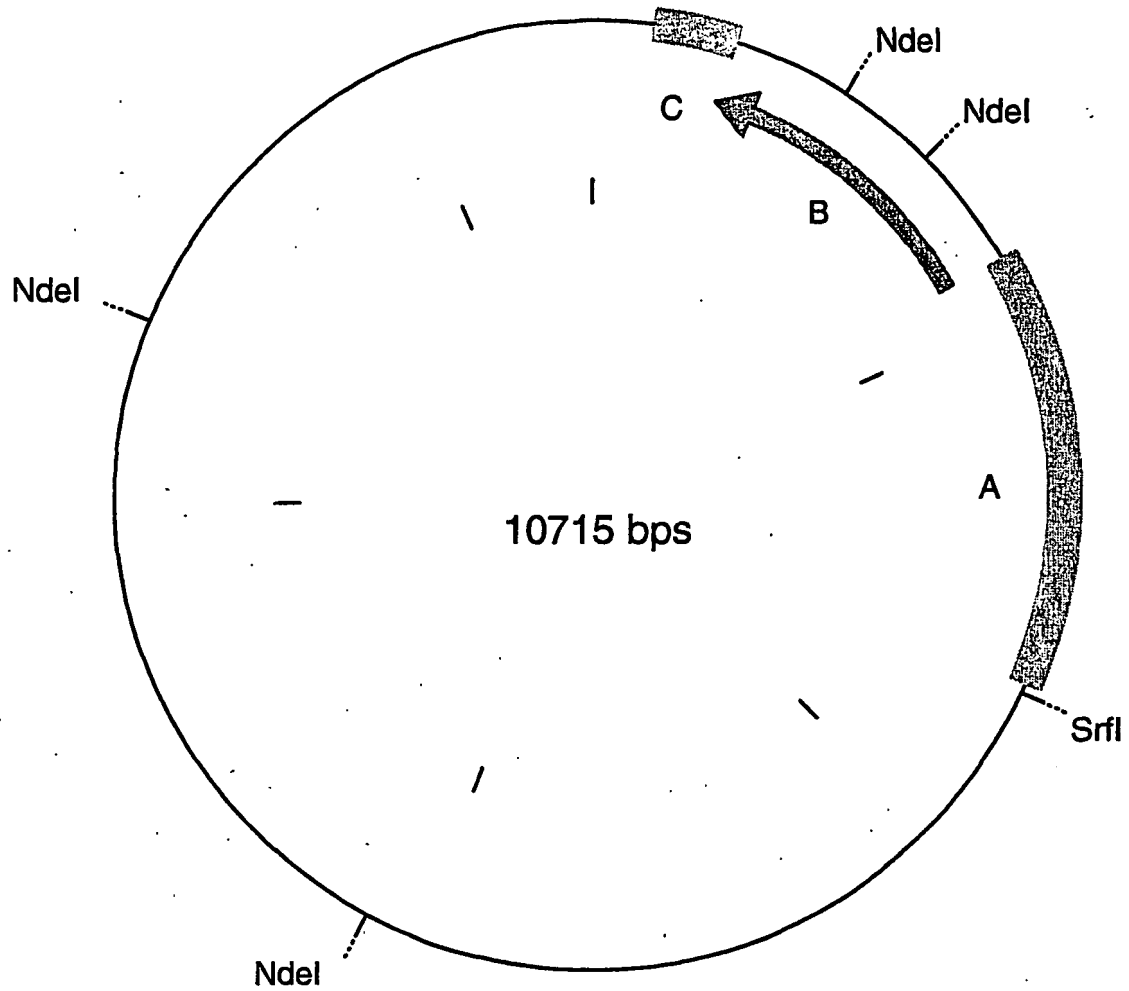
pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT



12/63

Abbildung 12:

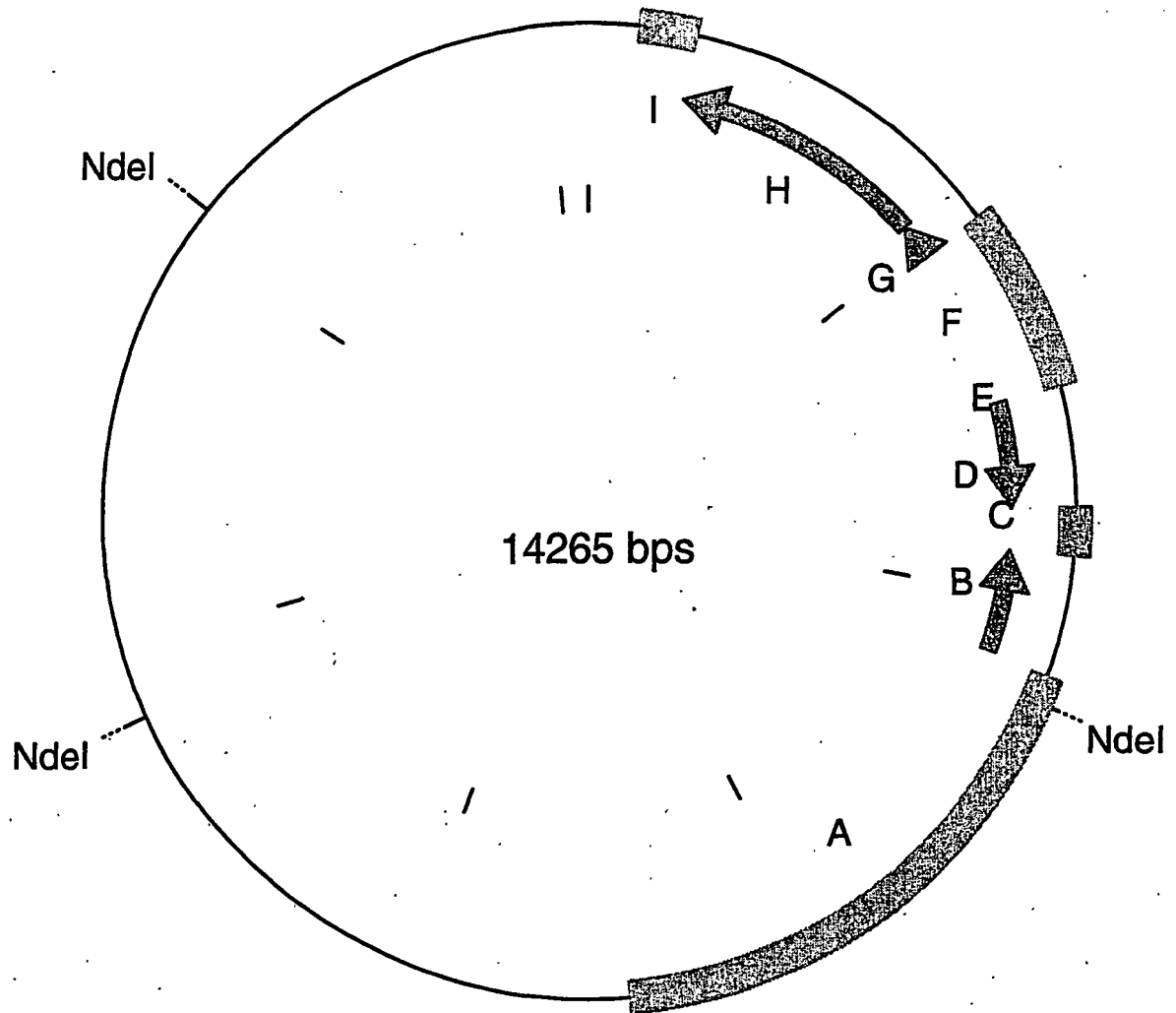
pSUN2-SBPP-AtγTMT-35sT



13/63

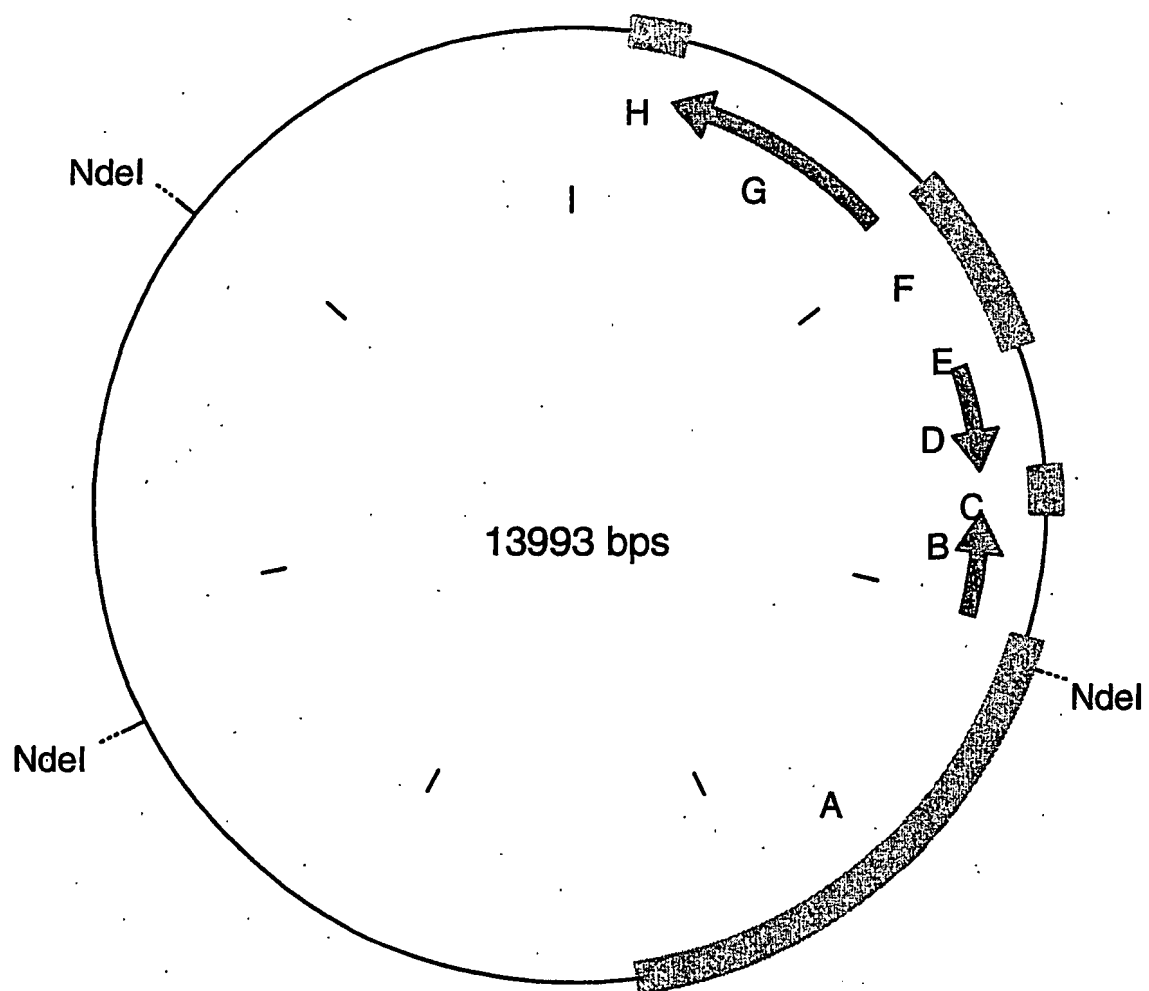
Abbildung 13:

**pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT-USPP-rbcS-RnTATase-nost**



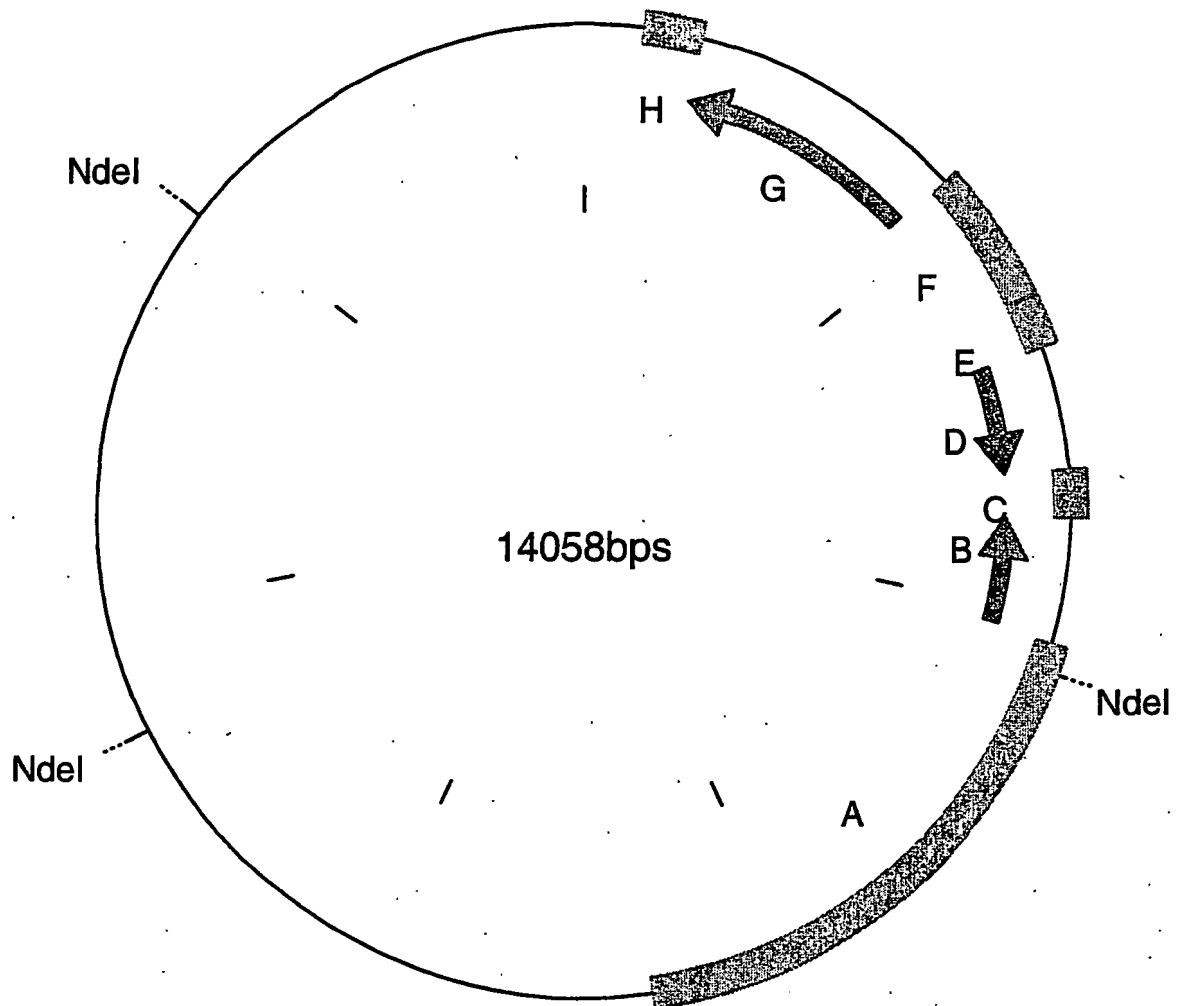
## Abbildung 14:

pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT-USPP-AtTATase1-nost



## Abbildung 15:

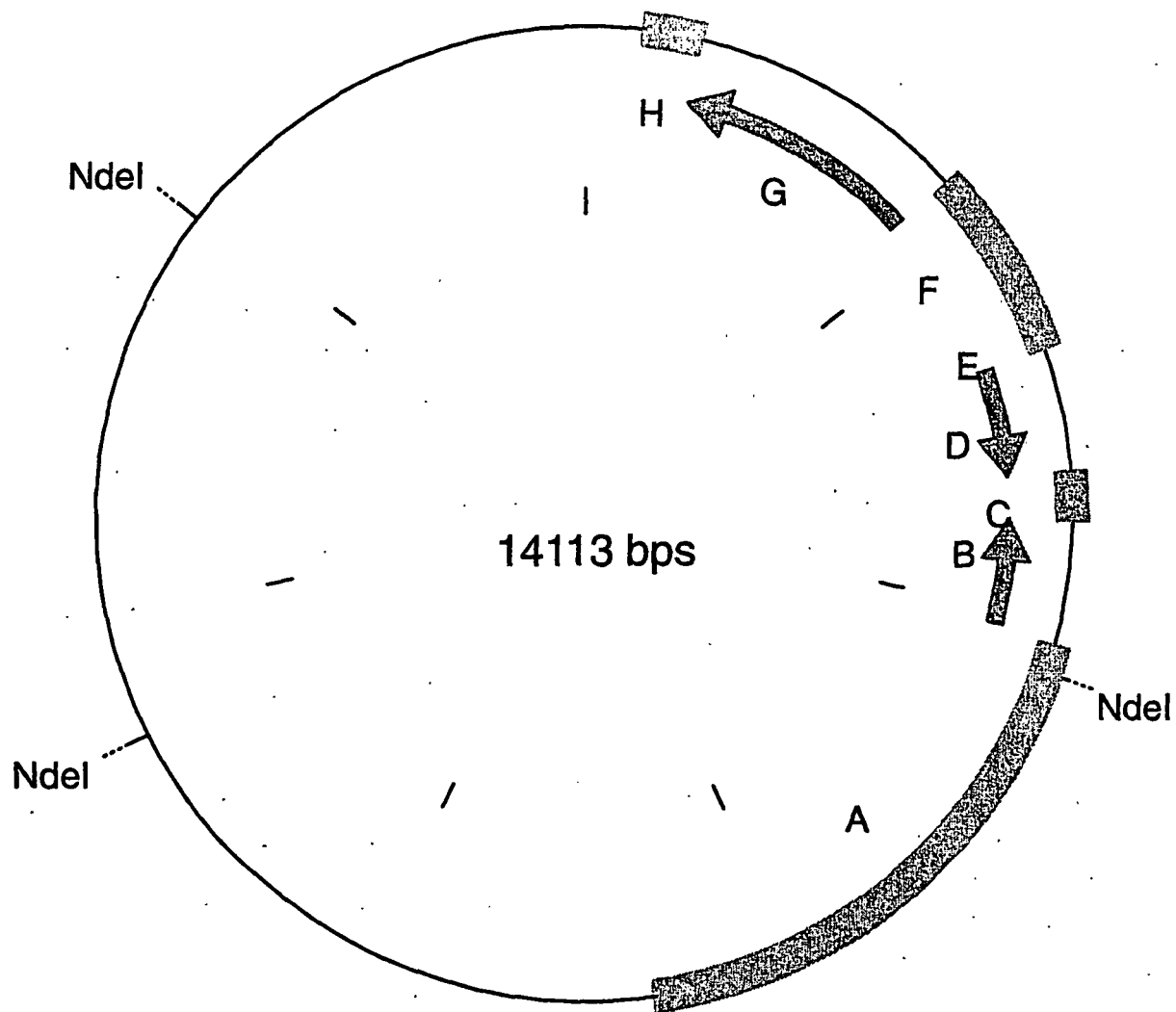
**pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocst-USPP-AtTATase3-nost**





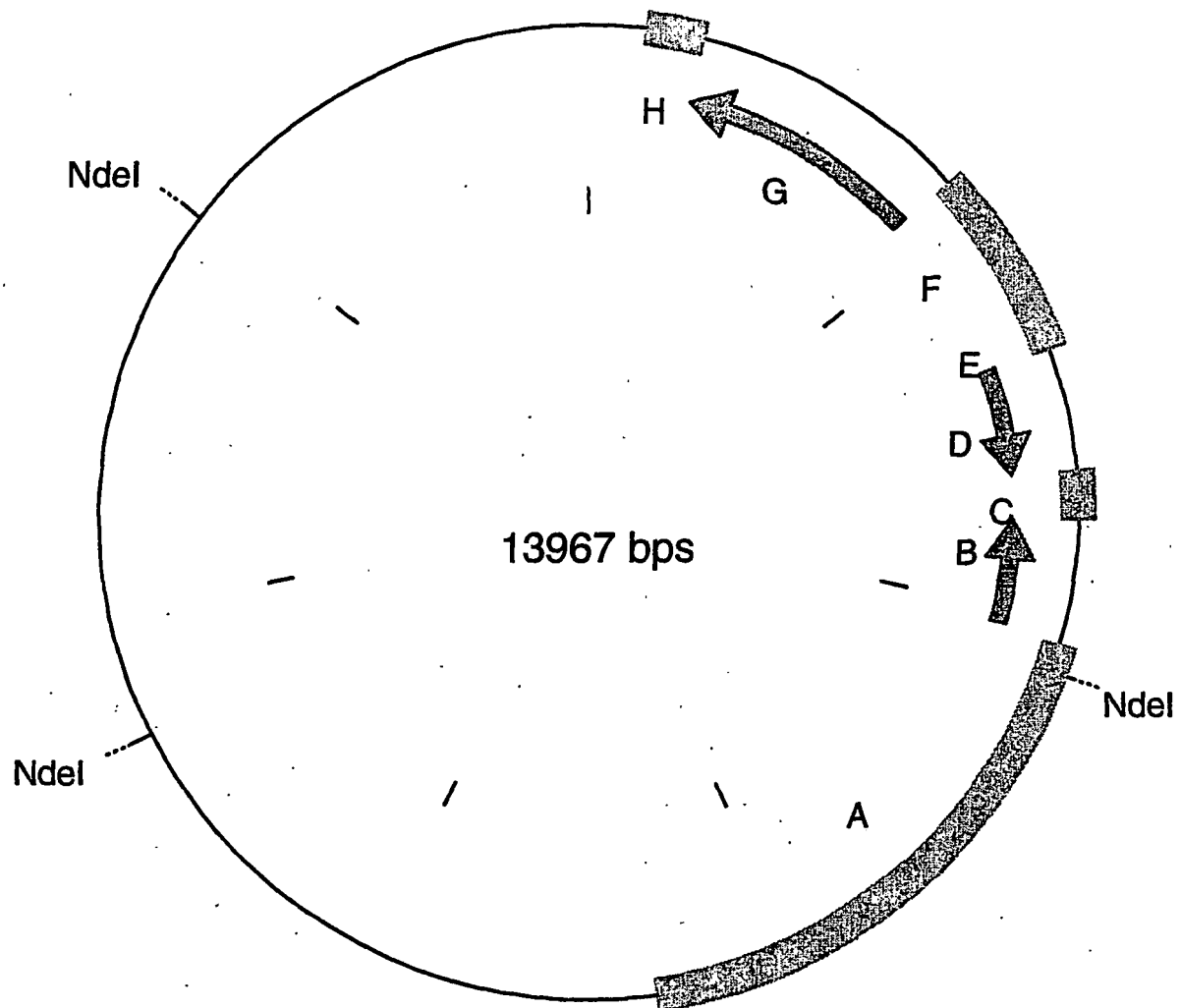
## Abbildung 16:

**pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT-USPP-AtTATase5-nost**

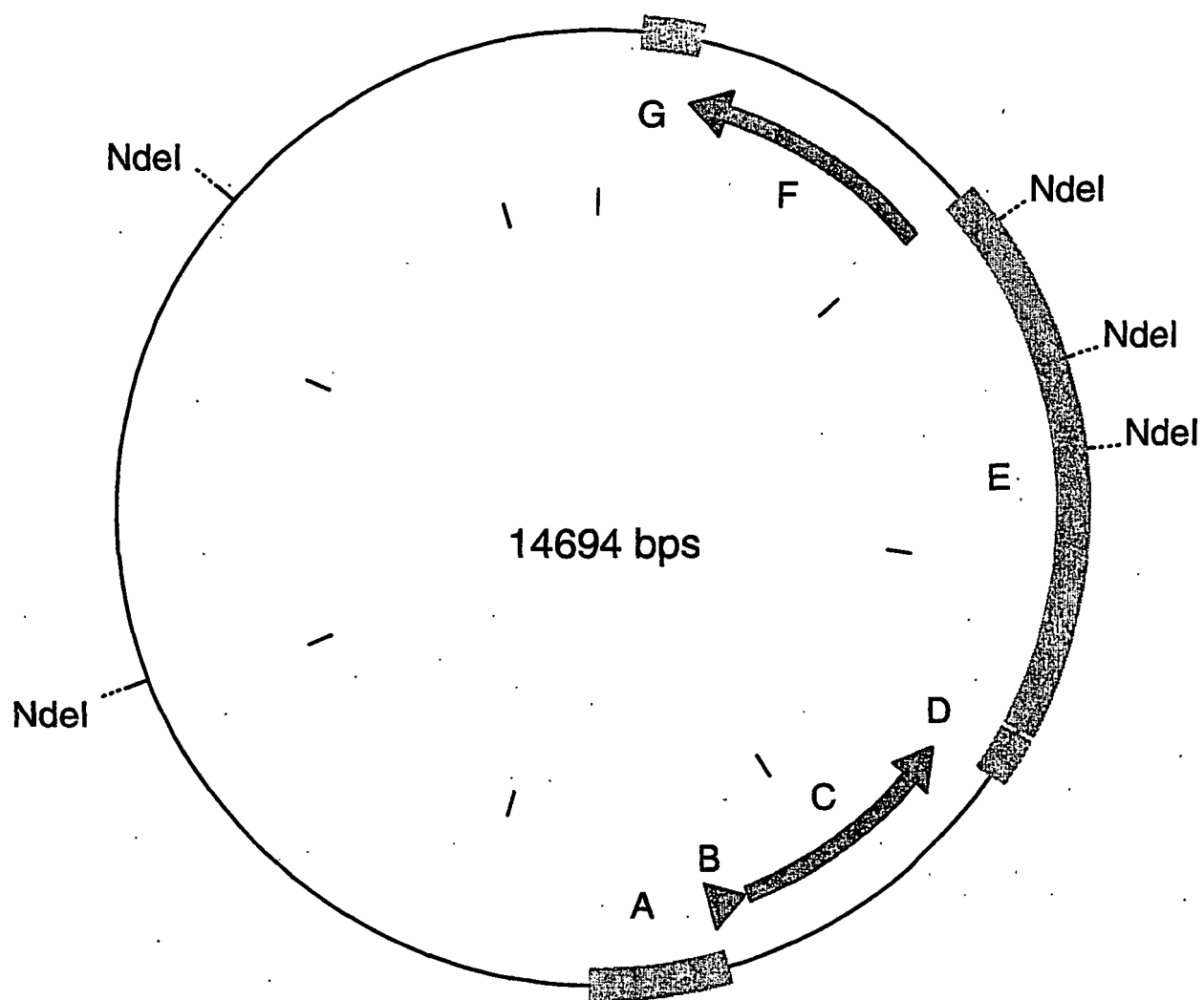


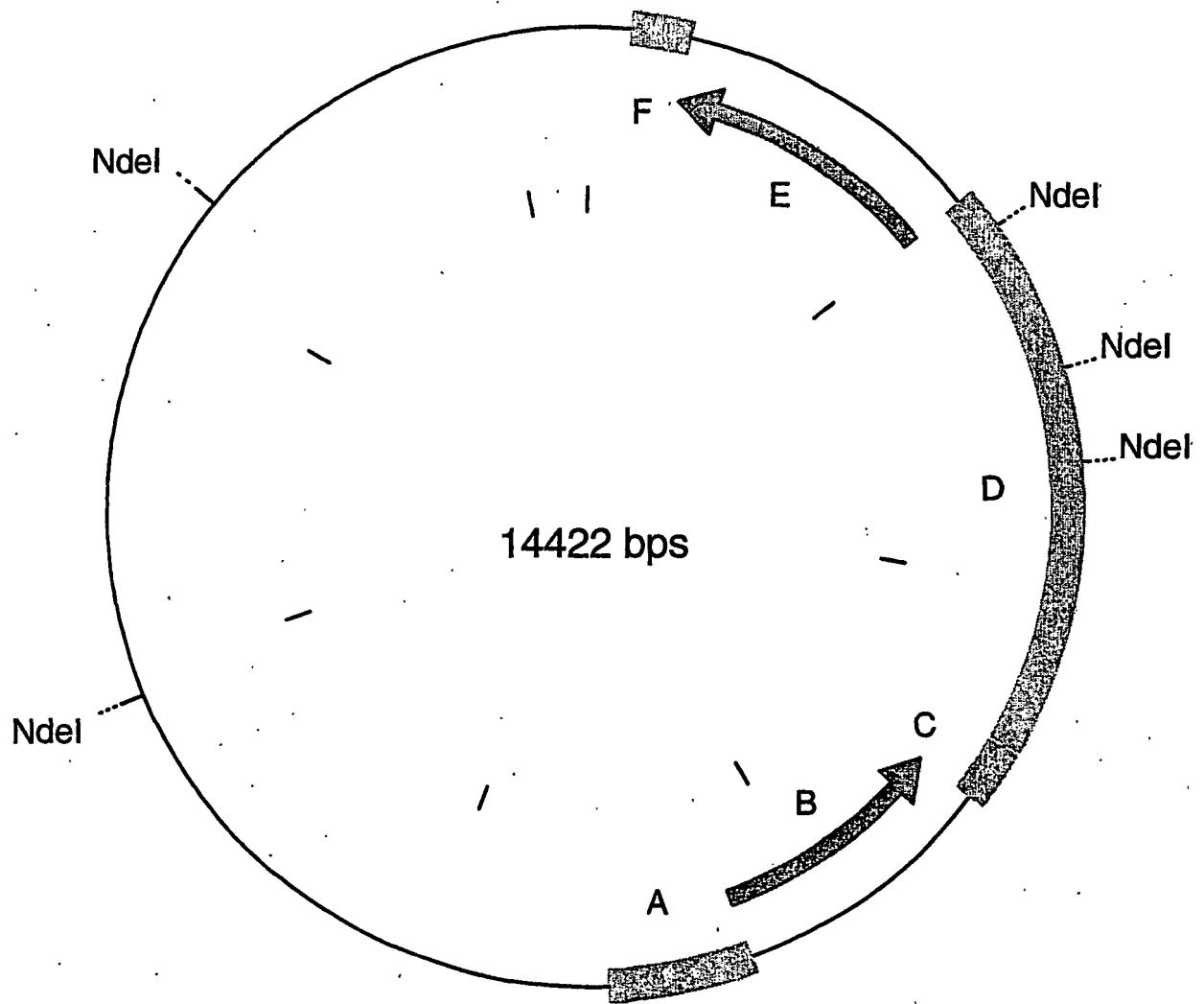
17/63

Abbildung 17:

**pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocst-USPP-AtTATase6-nosT**

**Abbildung 18: pSUN2-Leb4-NtGGPPOR-nost-USPP-rbcS-RnTATase-nost**



**Abbildung 19: pSUN2-Leb4-NtGGPPOR-nosT-USPP-AttTATase1-nosT**

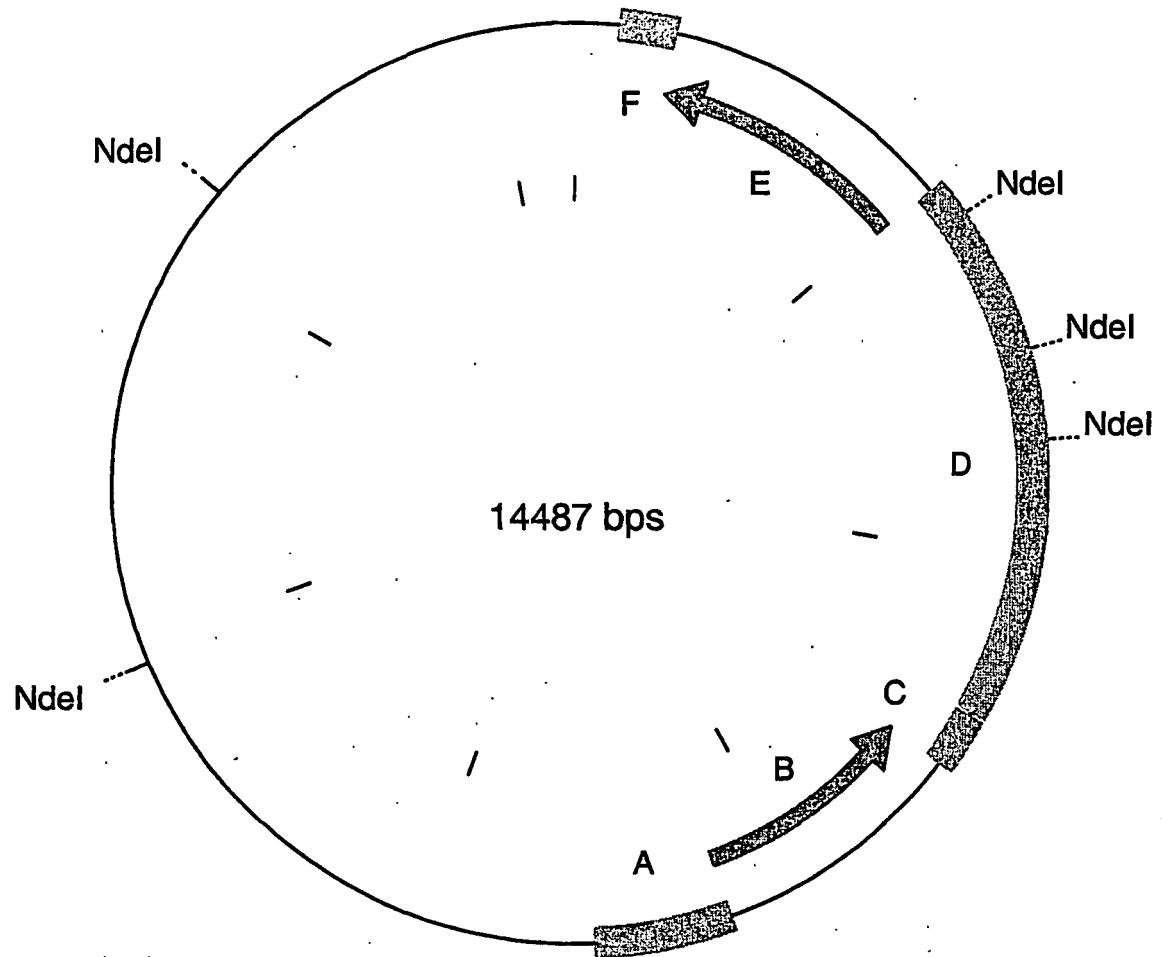
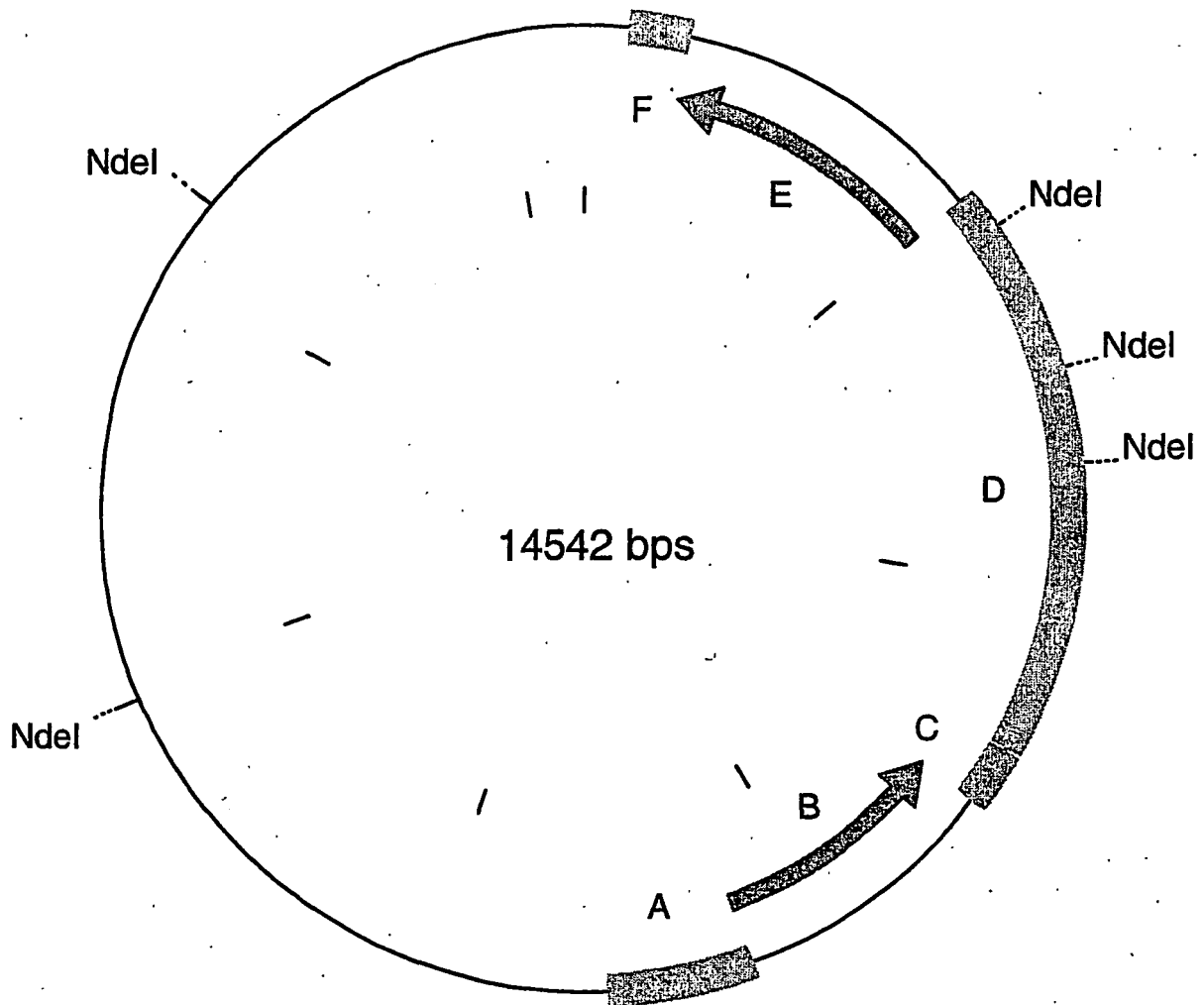
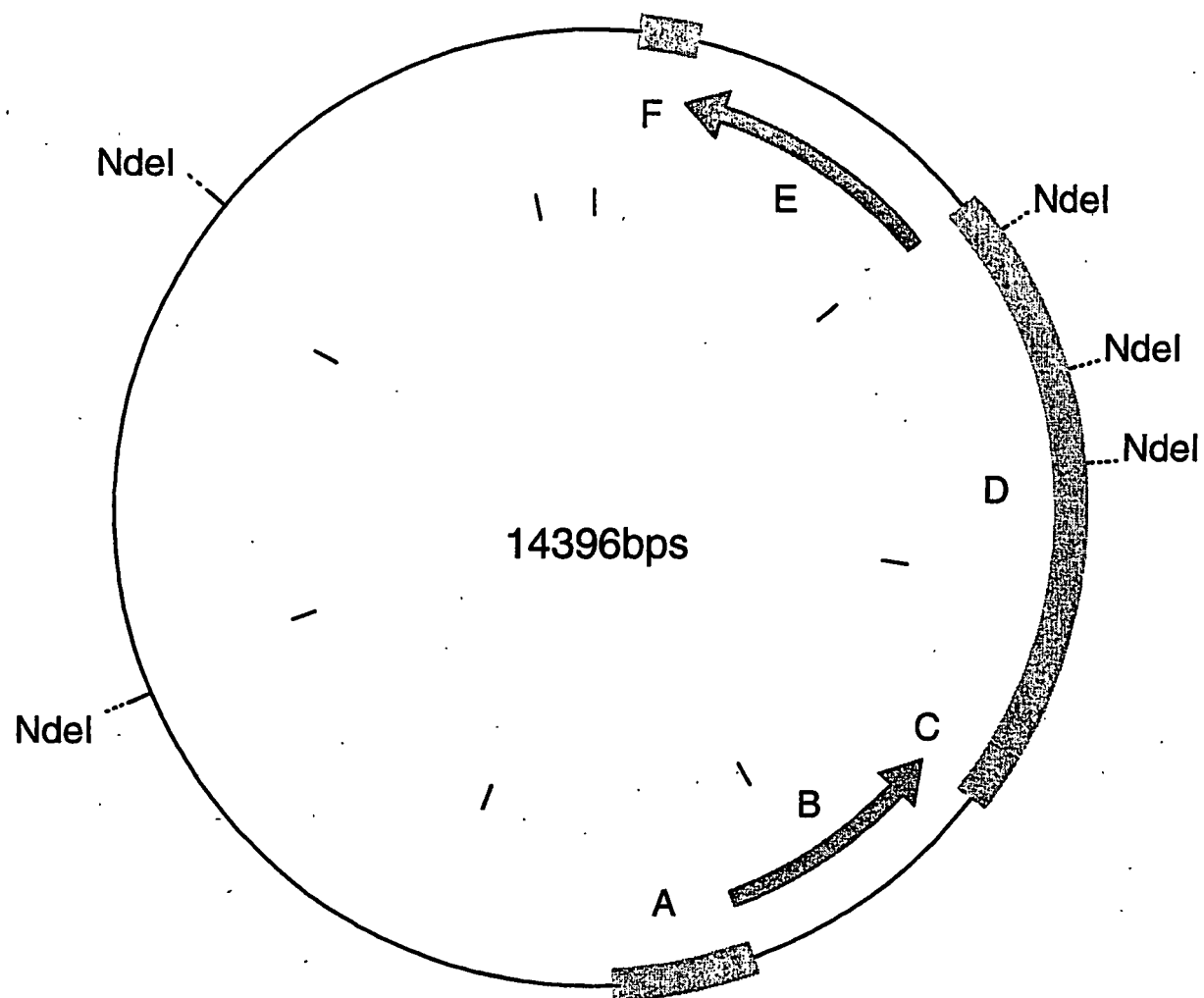
**Abbildung 20: pSUN2-Leb4-NtGGPPOR-nosT-USPP-AtTATase3-nosT**

Abbildung 21: pSUN2-Leb4-NtGGPPOR-nost-USPP-AtTATase5-nost



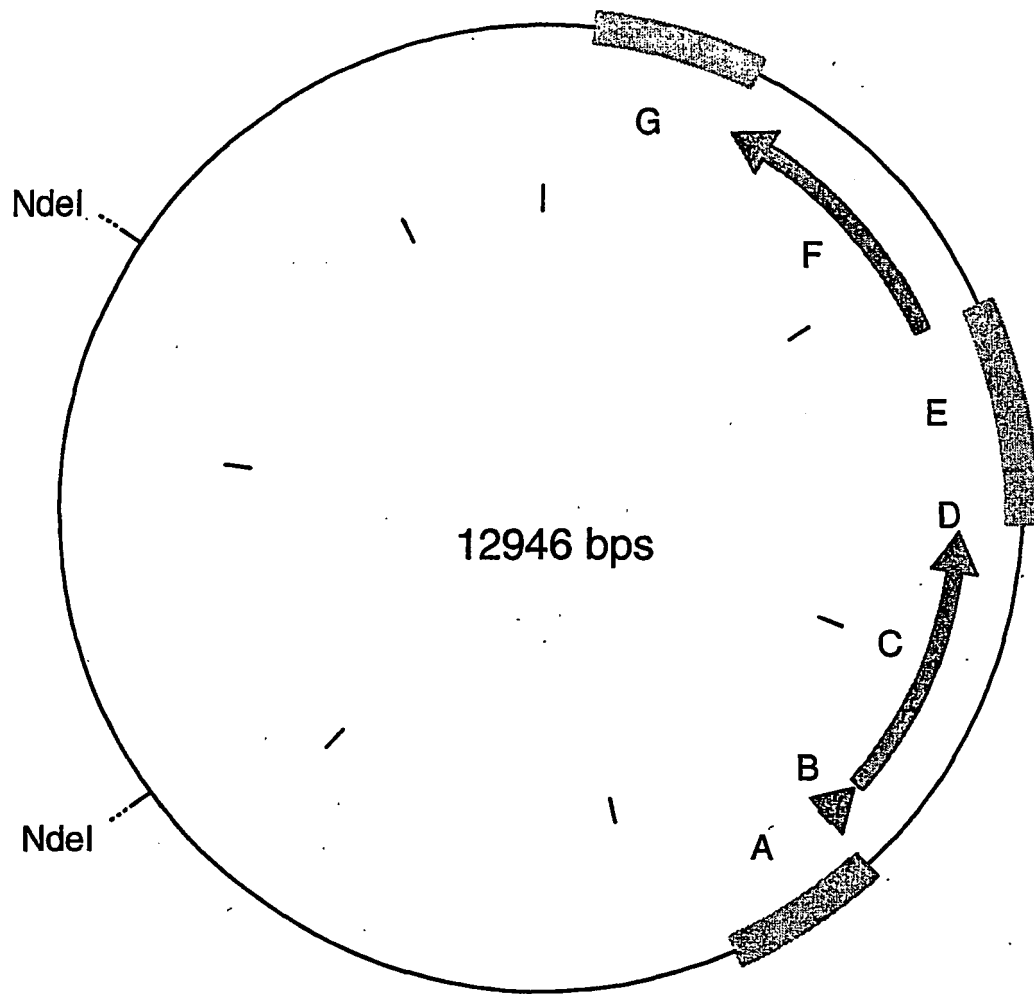
22/63

Abbildung 22: pSUN2-Leb4-NtGGPPOR-nost-USPP-AtTATase6-nost



23/63

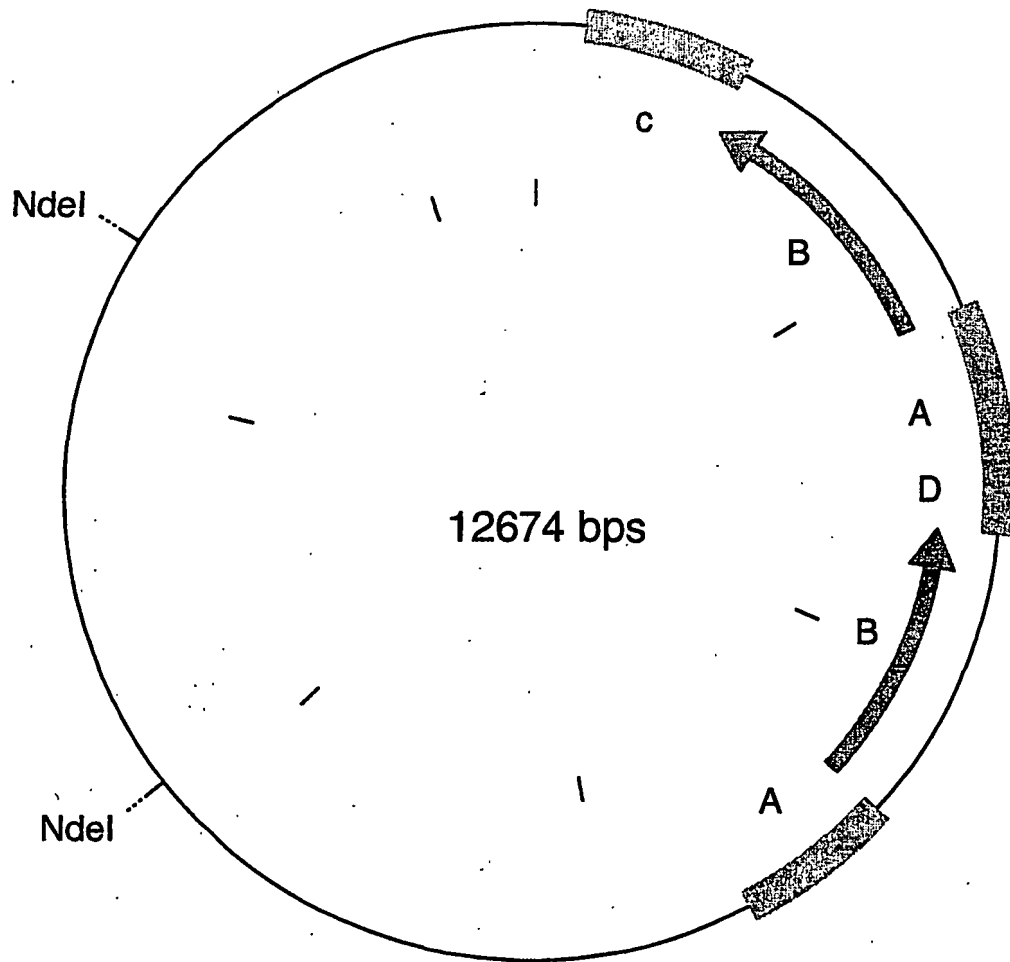
Abbildung 23: pSUN2-USP-AthHPPD-ocsT-USPP-rbcS-RnTATase-nost





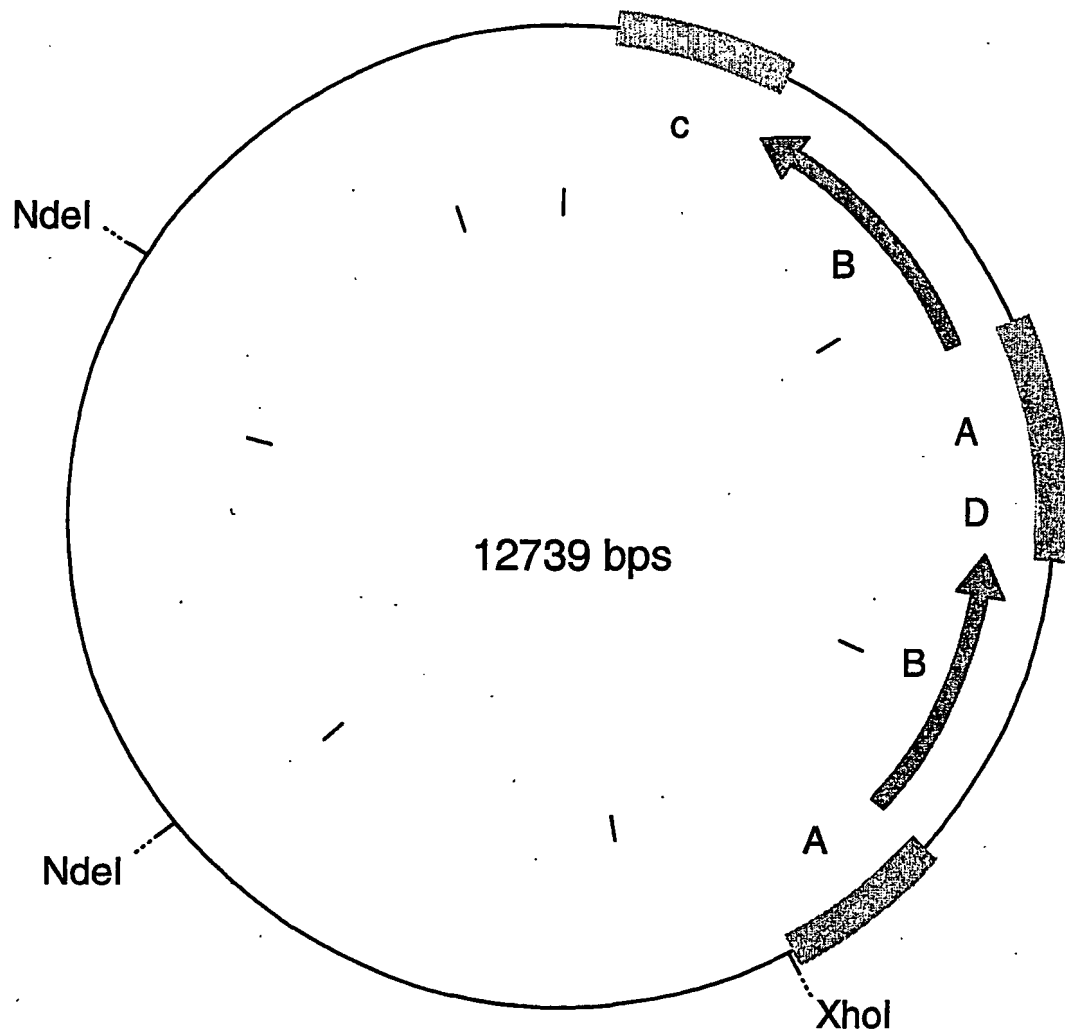
24/63

Abbildung 24: pSUN2-USP-AthHPPD-ocsT-USPP-AtTATase1-nost



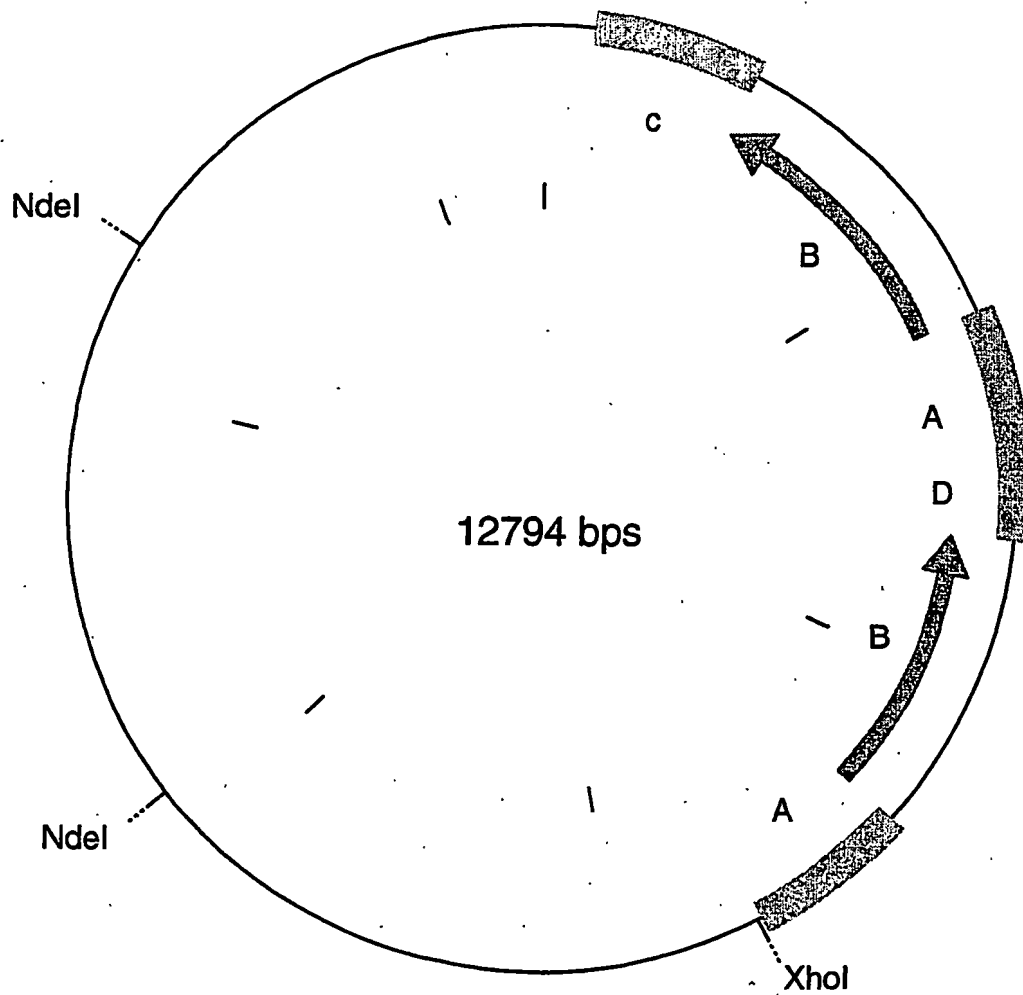
**25 / 63**

**Abbildung 25: pSUN2-USP-AtHPPD-ocsT-USPP-AtTATase3-nosT**



26/63

Abbildung 26: pSUN2-USP-AtHPPD-ocsT-USPP-AtTATase5-nost



27/63

Abbildung 27: pSUN2-USP-AtHPPD-ocsT-USPP-AtTATase6-nosT

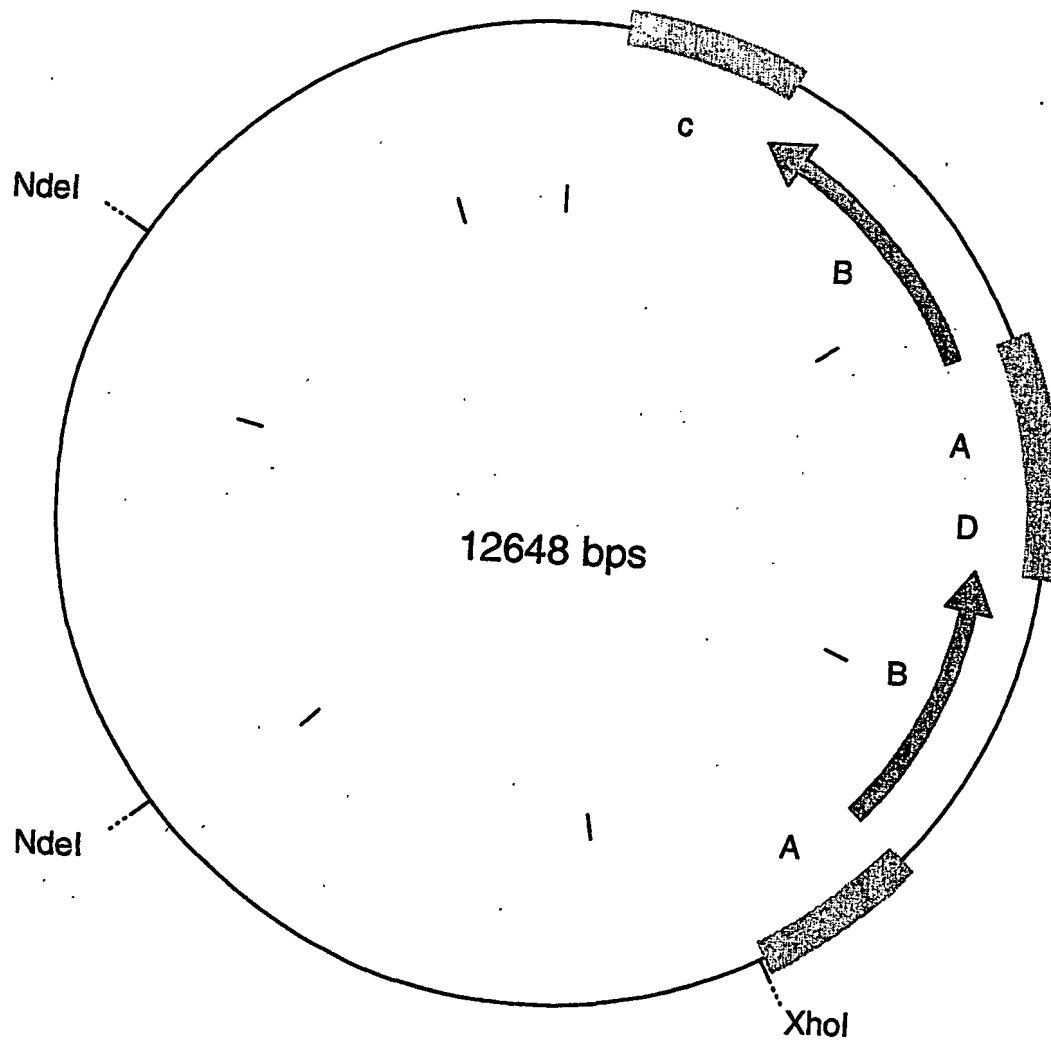
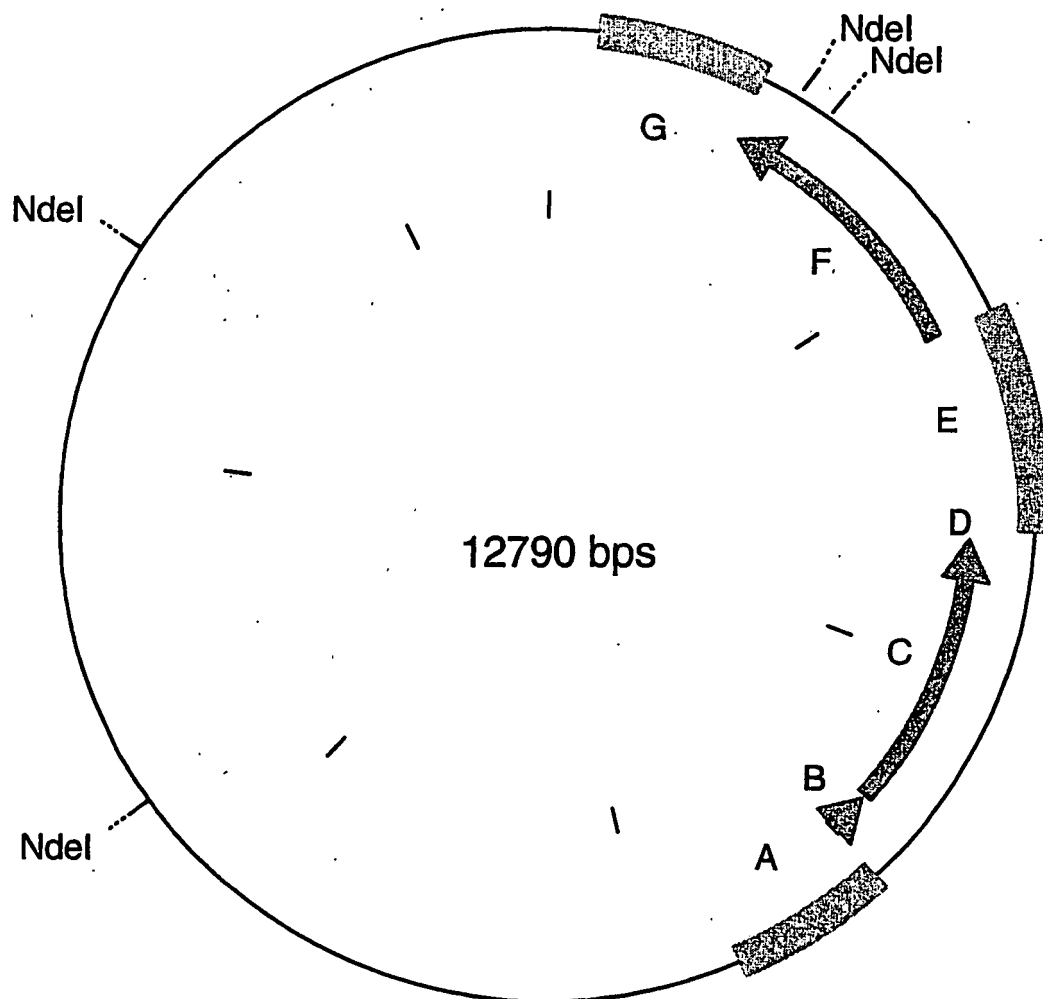
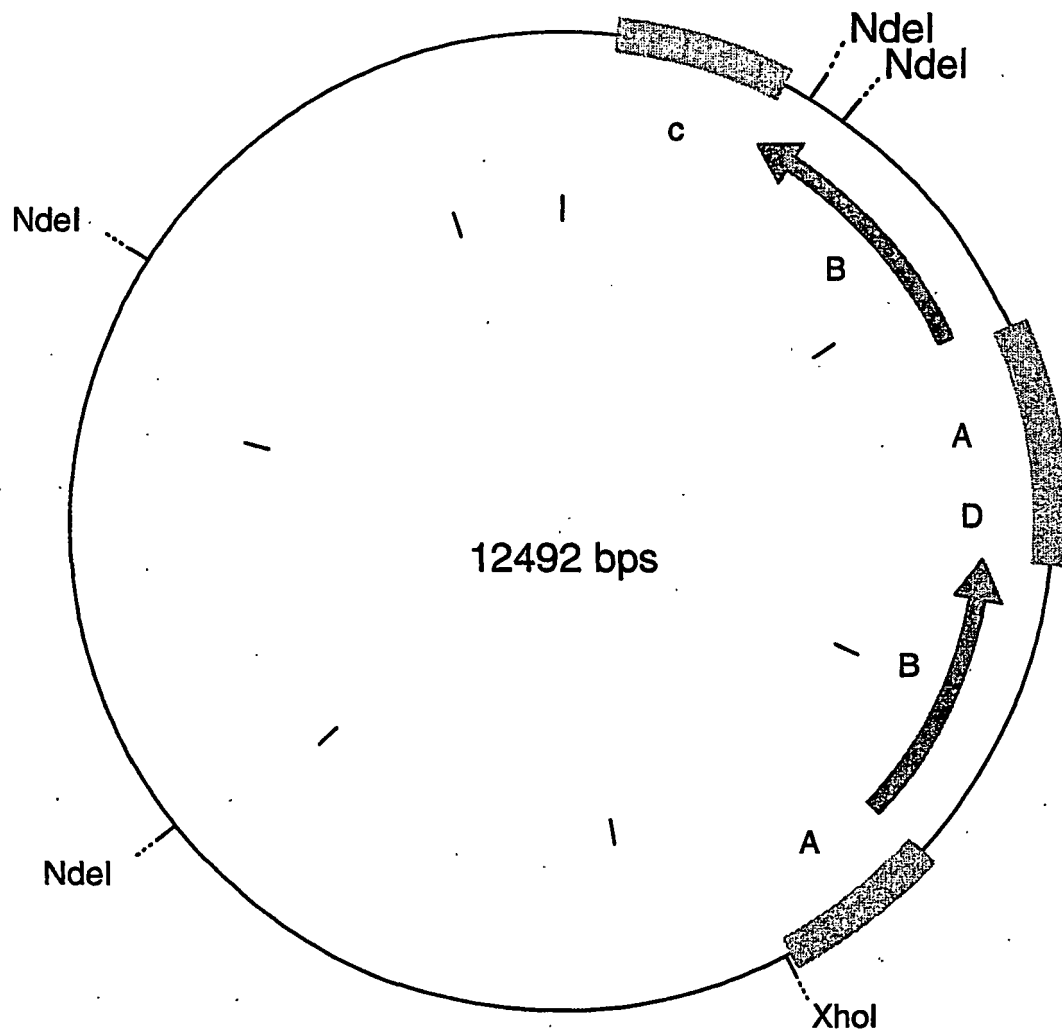


Abbildung 28: pSUN2-USP-AthPT-ocst-USPP-rbcS-RnTATase6-nost



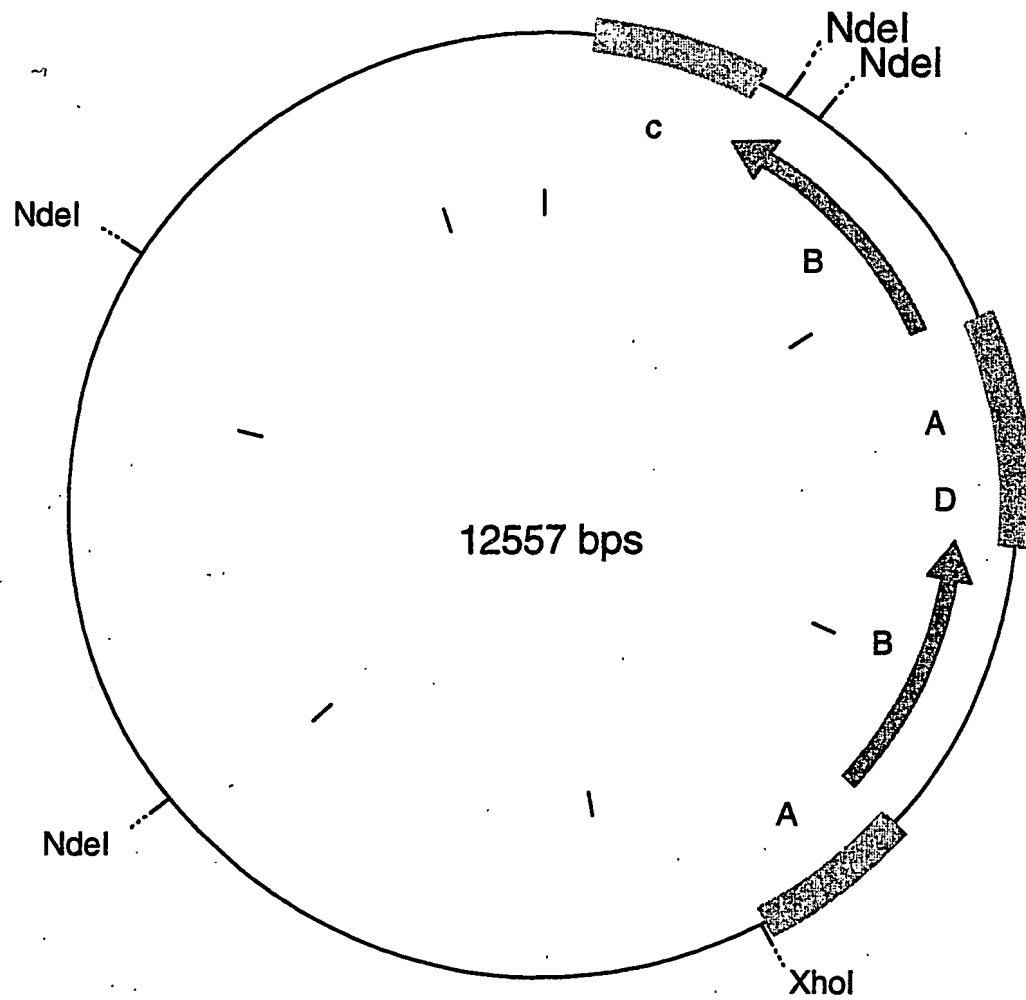
29/63

Abbildung 29: pSUN2-USP-AtHPT-ocsT-USPP-AtTATase1-nosT



30/63

Abbildung 30: pSUN2-USP-AtHPT-ocsT-USPP-AtTATase3-nost



31/63

Abbildung 31: pSUN2-USP-AtHPT-ocsT-USPP-AtTATase5-nost

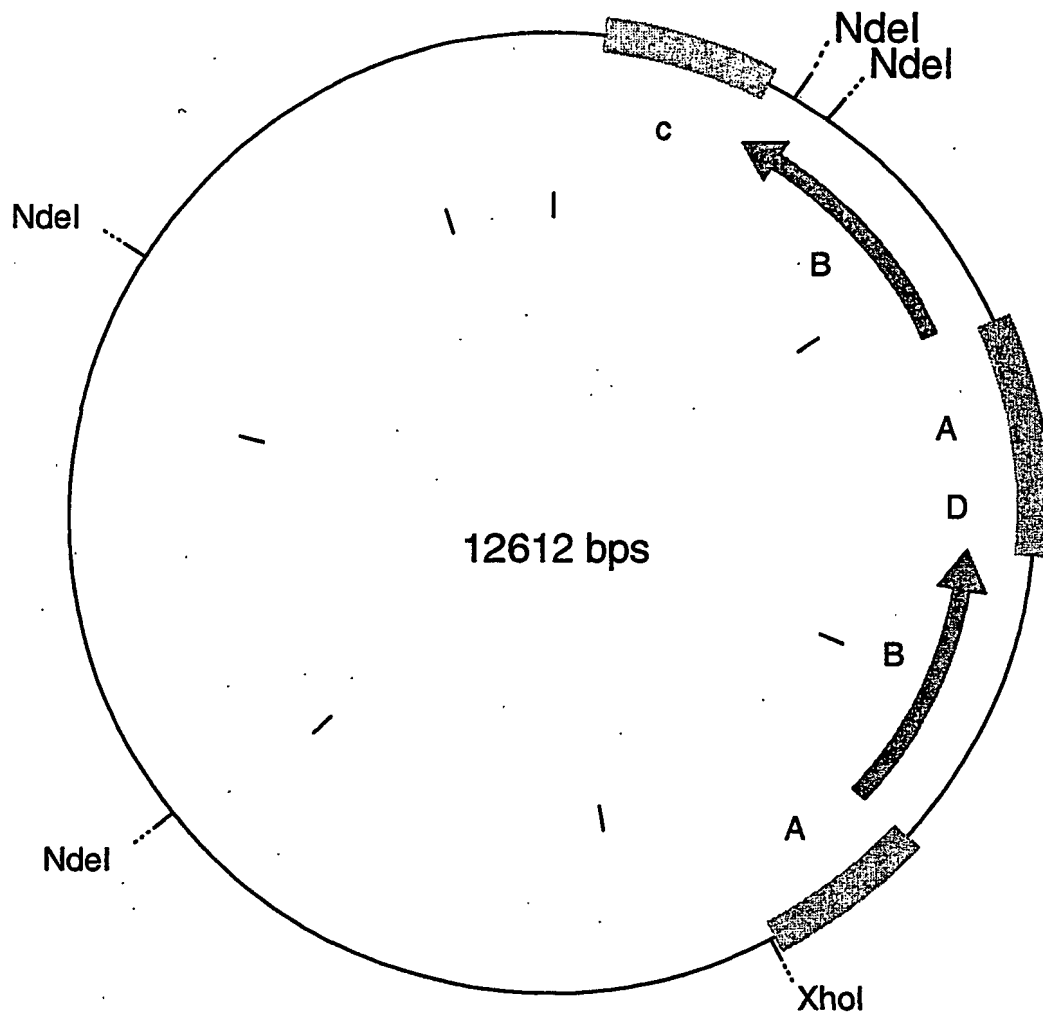
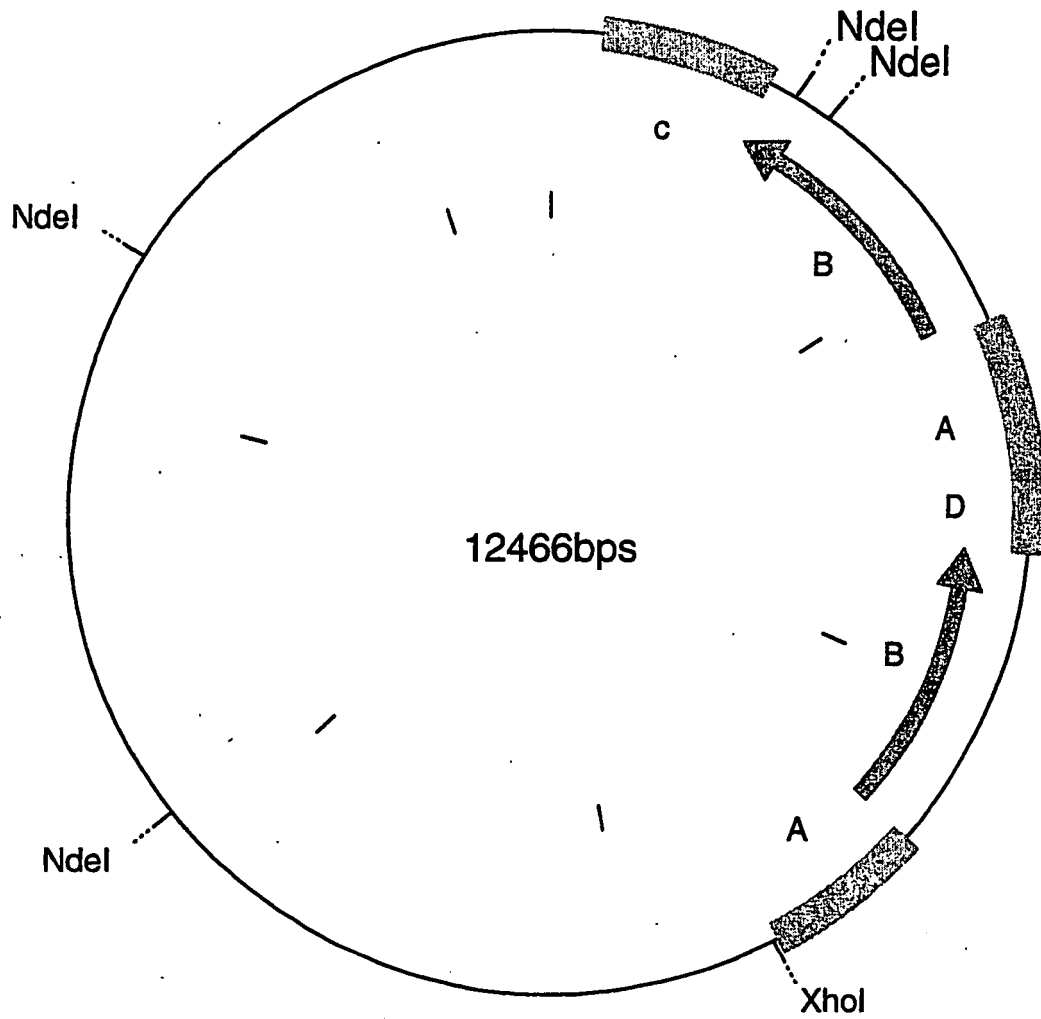


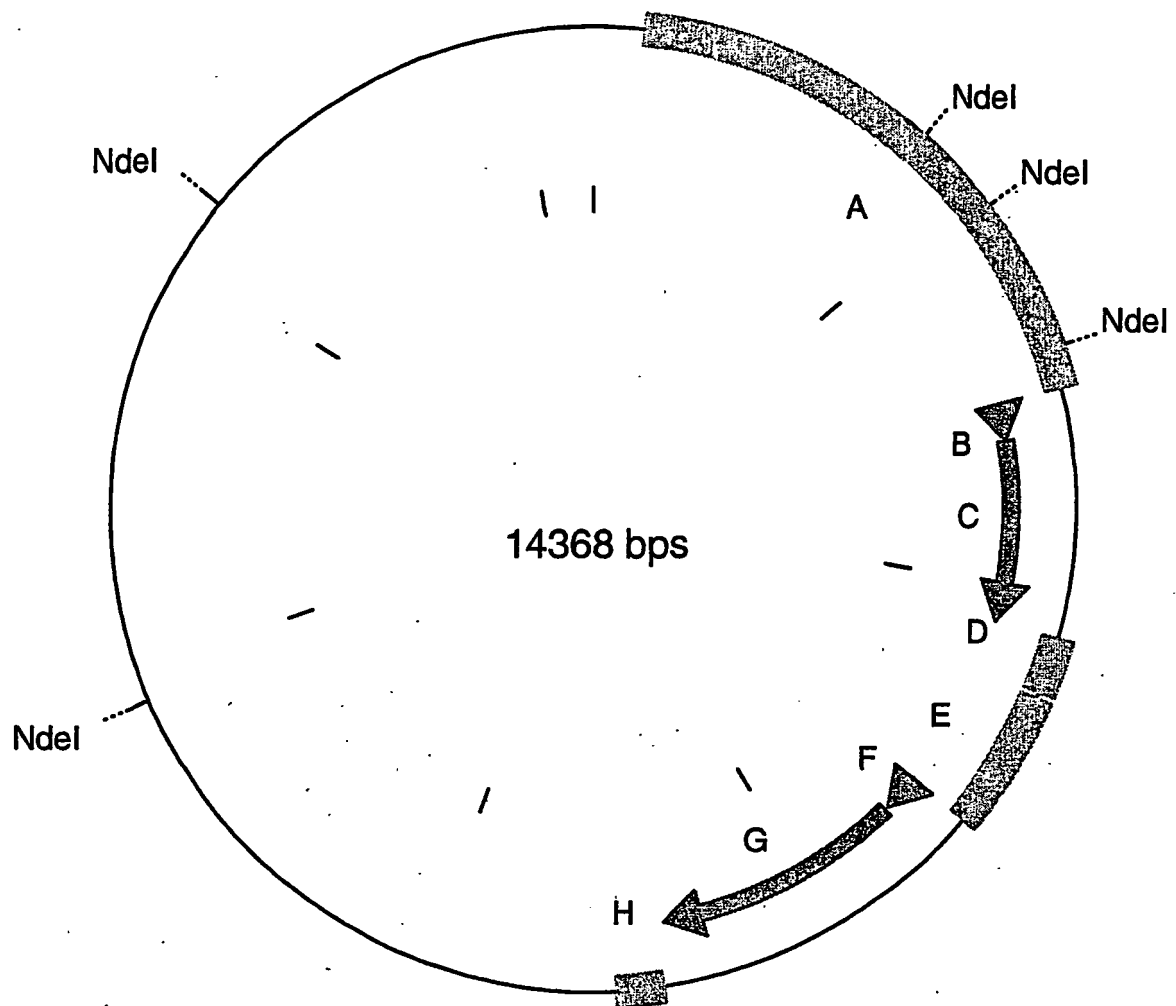


Abbildung 32: pSUN2-USP-AtHPT-ocst-USPP-AtTATase6-nost



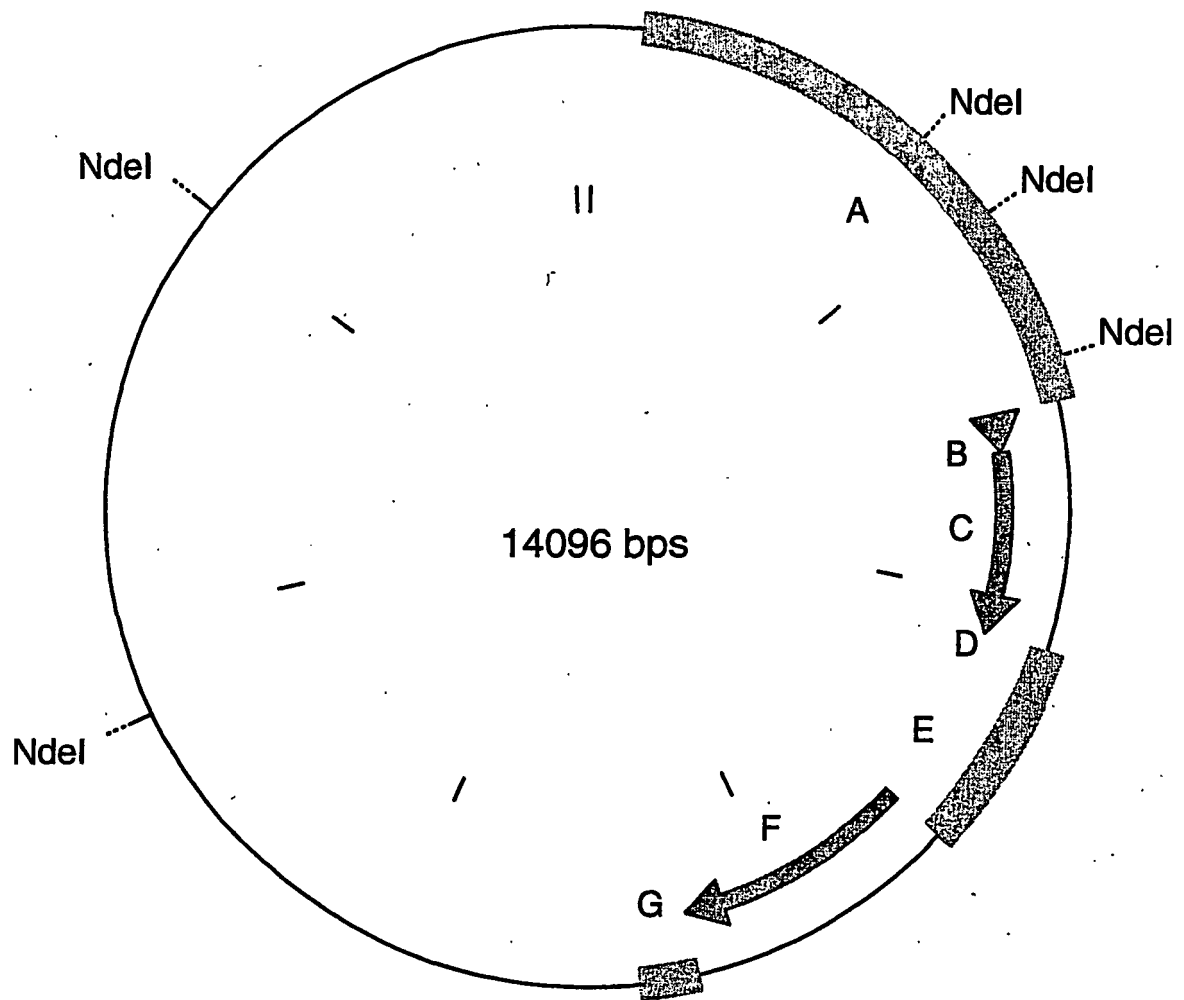
33/63

**Abbildung 33: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nost-USPP-rbcS-RnTATase-nost**

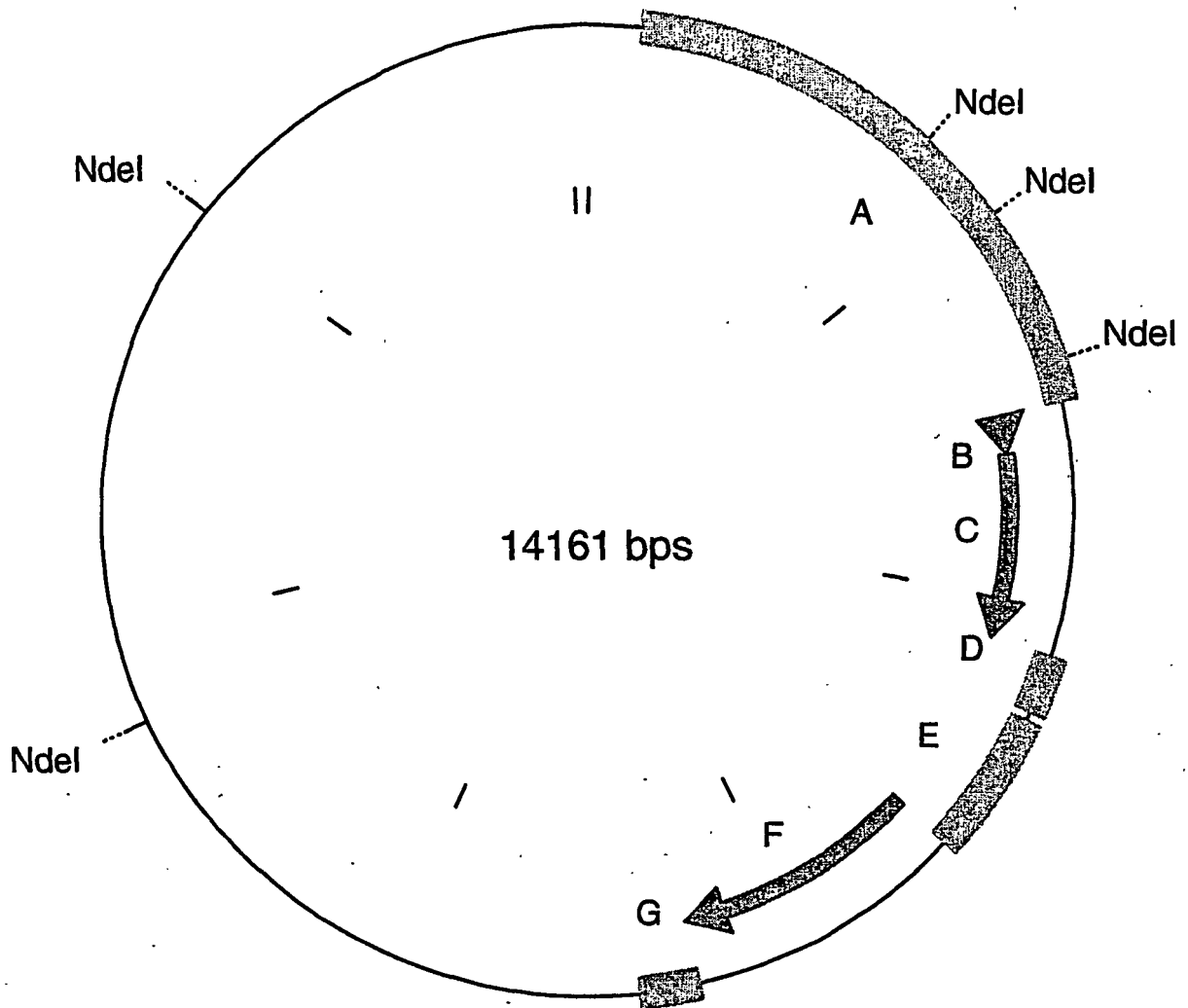


34/63

Abbildung 34: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nosT-USPP-AttATase1-nosT

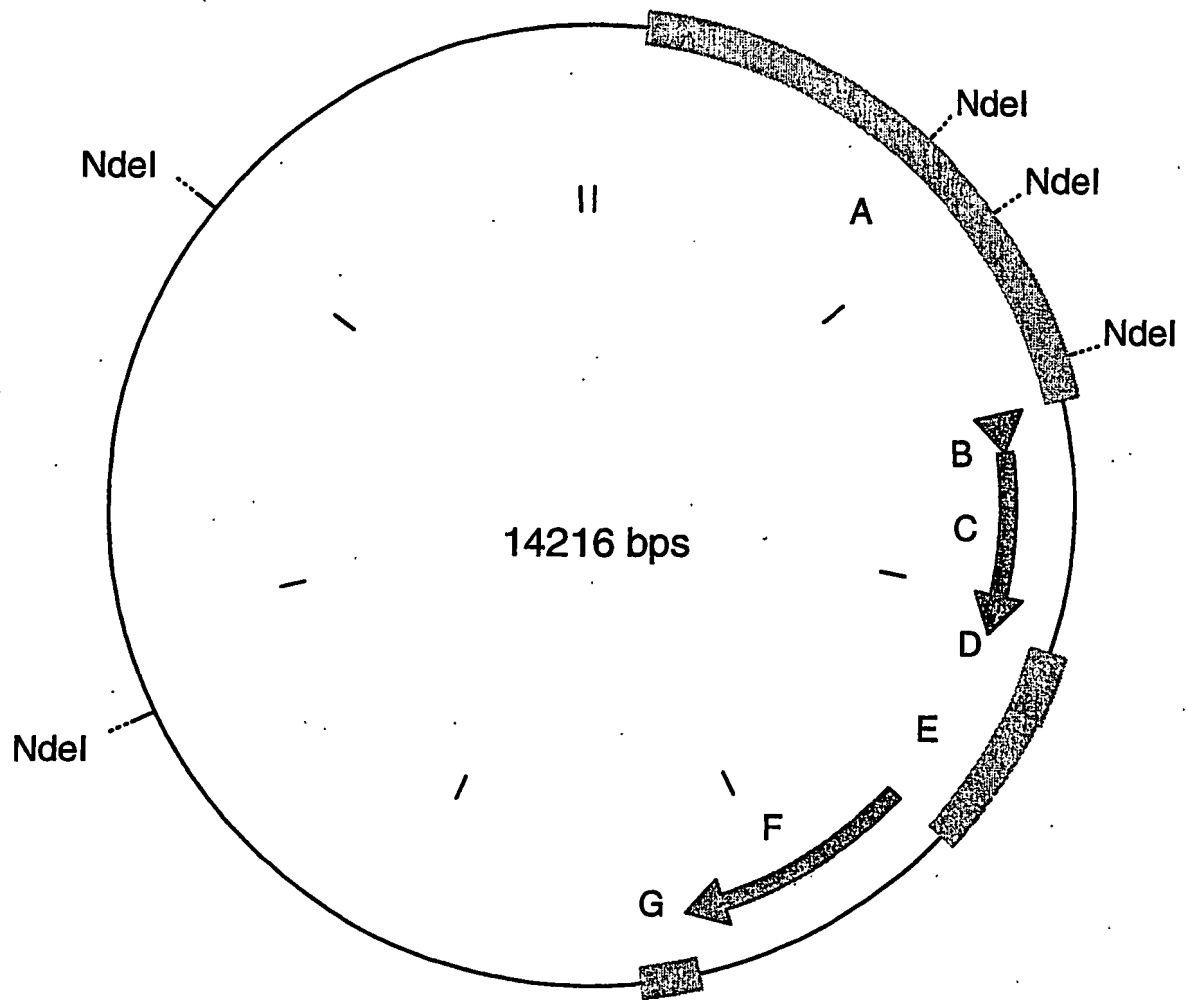


35/63

**Abbildung 35: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nost-USPP-AtTATase3-nost**

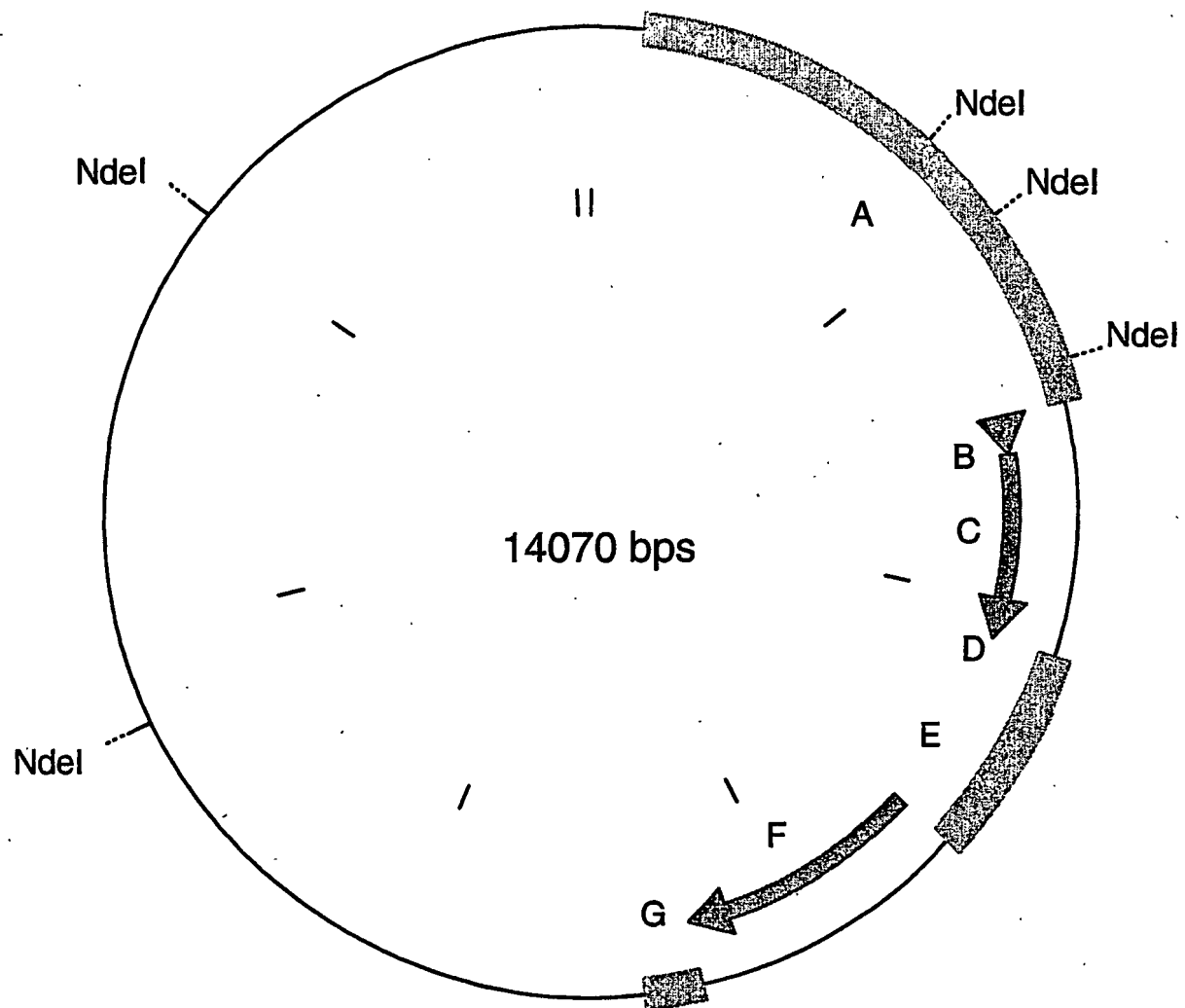
36/63

Abbildung 36: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nost-USPP-AtTATase5-nost



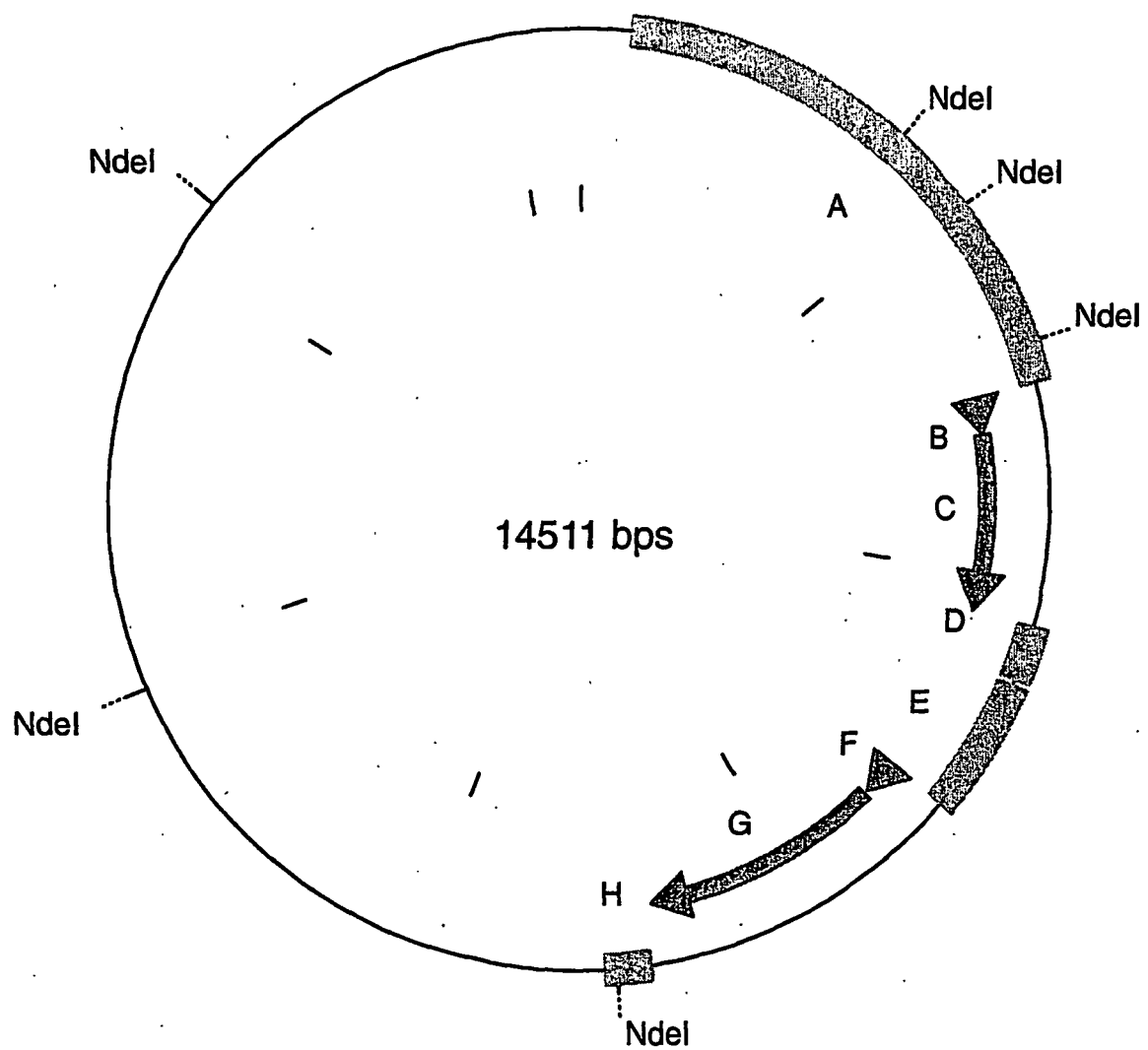
37/63

Abbildung 37: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nost-USPP-AtTATase6-nost



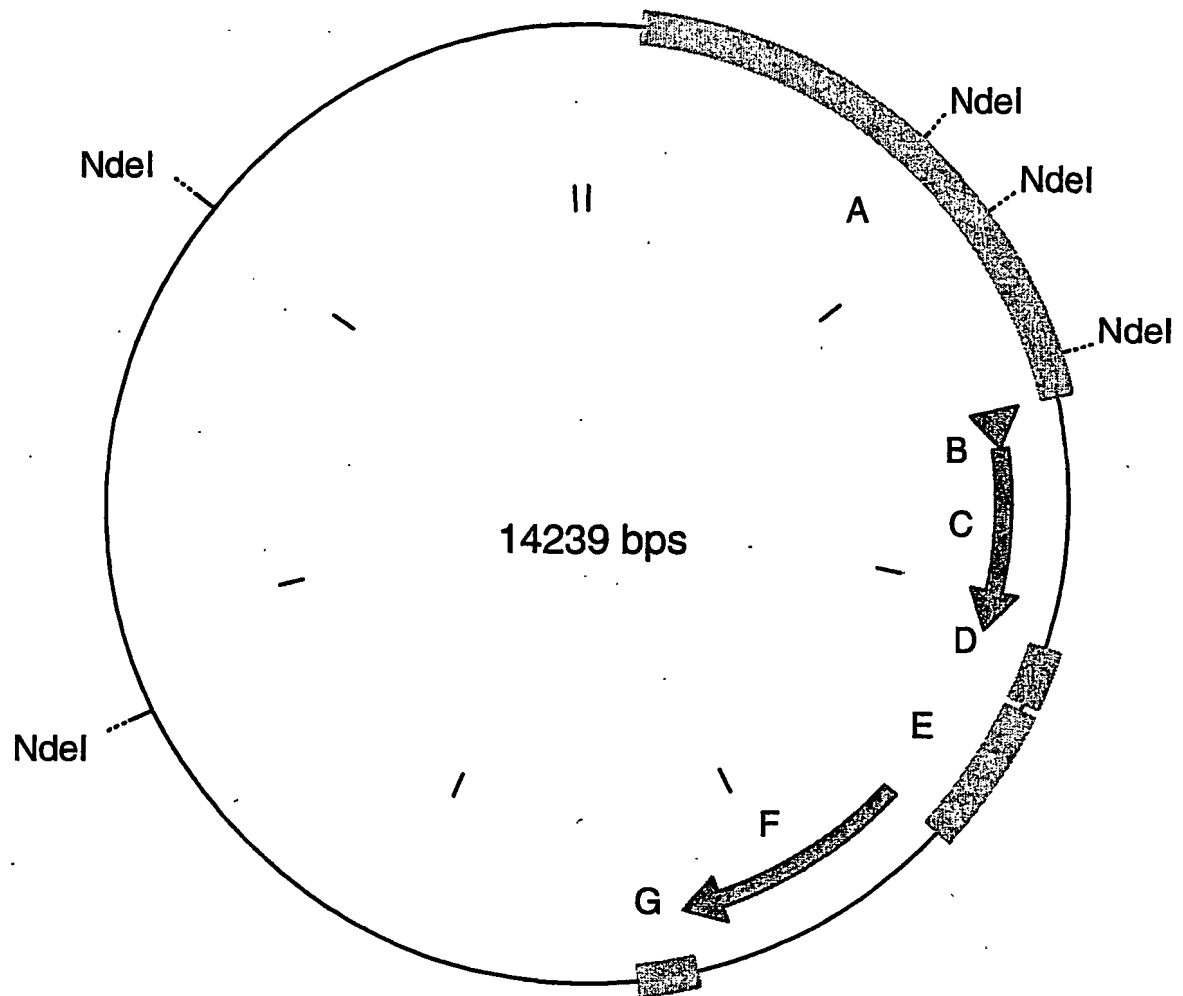
38/63

Abbildung 38: pSUN2-Leb4-IPP-SynCyc-nosT-USPP-rbcS-RnTA-Tase-nosT



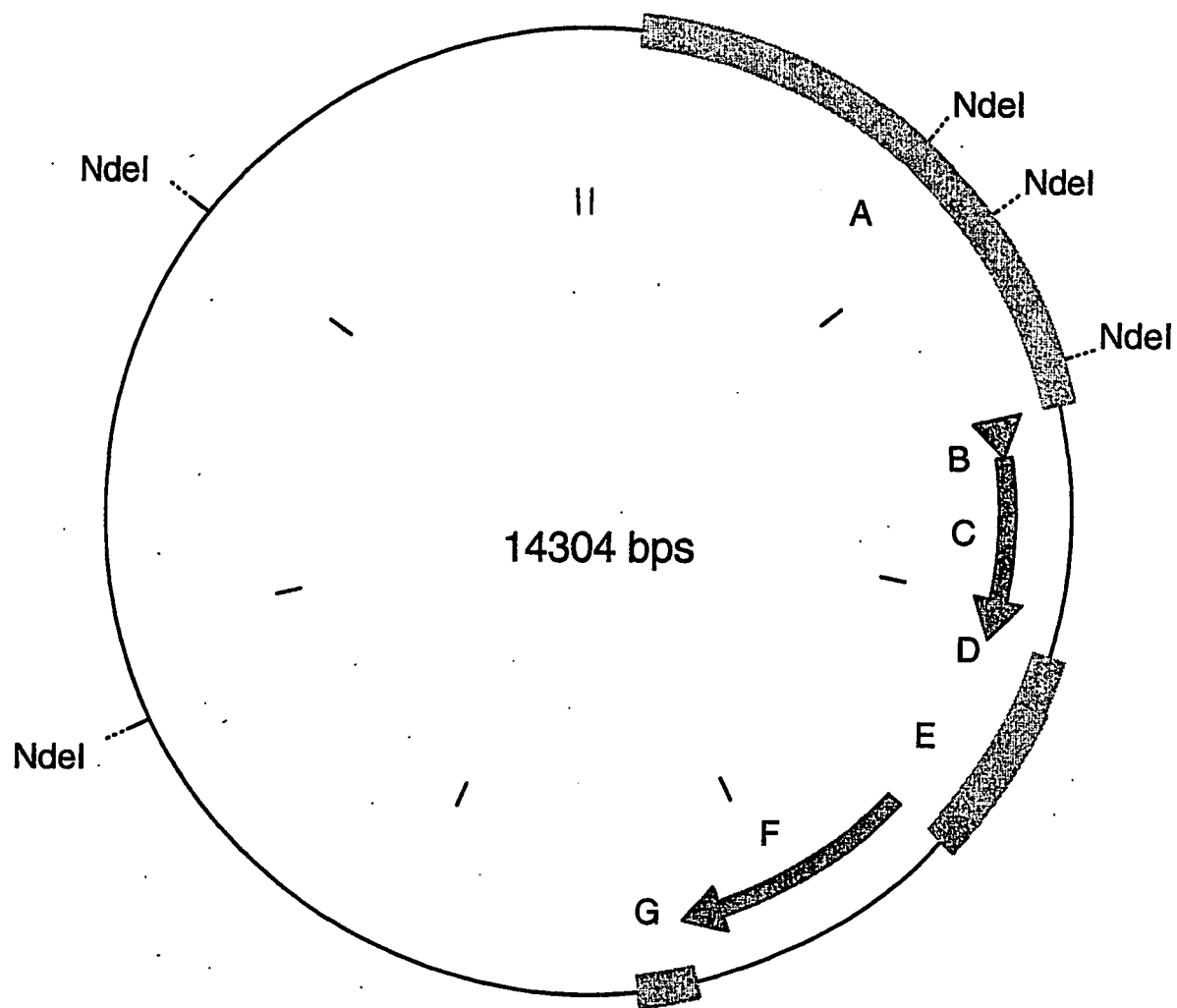
39/63

Abbildung 39: pSUN2-Leb4-IPP-SynCyc-nost-USPP-AtTATase1-nost



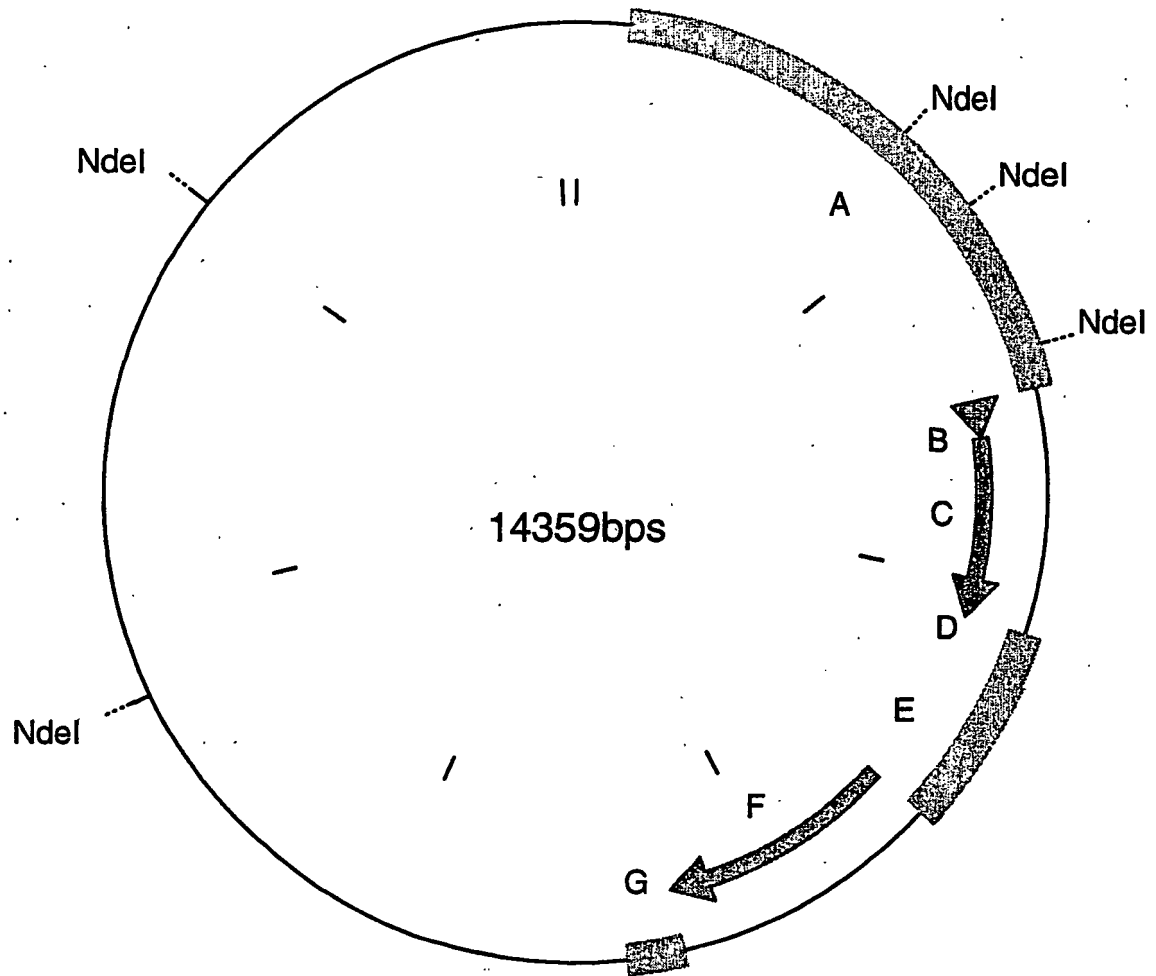


40/63

**Abbildung 40: pSUN2-Leb4-IPP-SynCyc-nosT-USPP-AtTATase3-nosT**

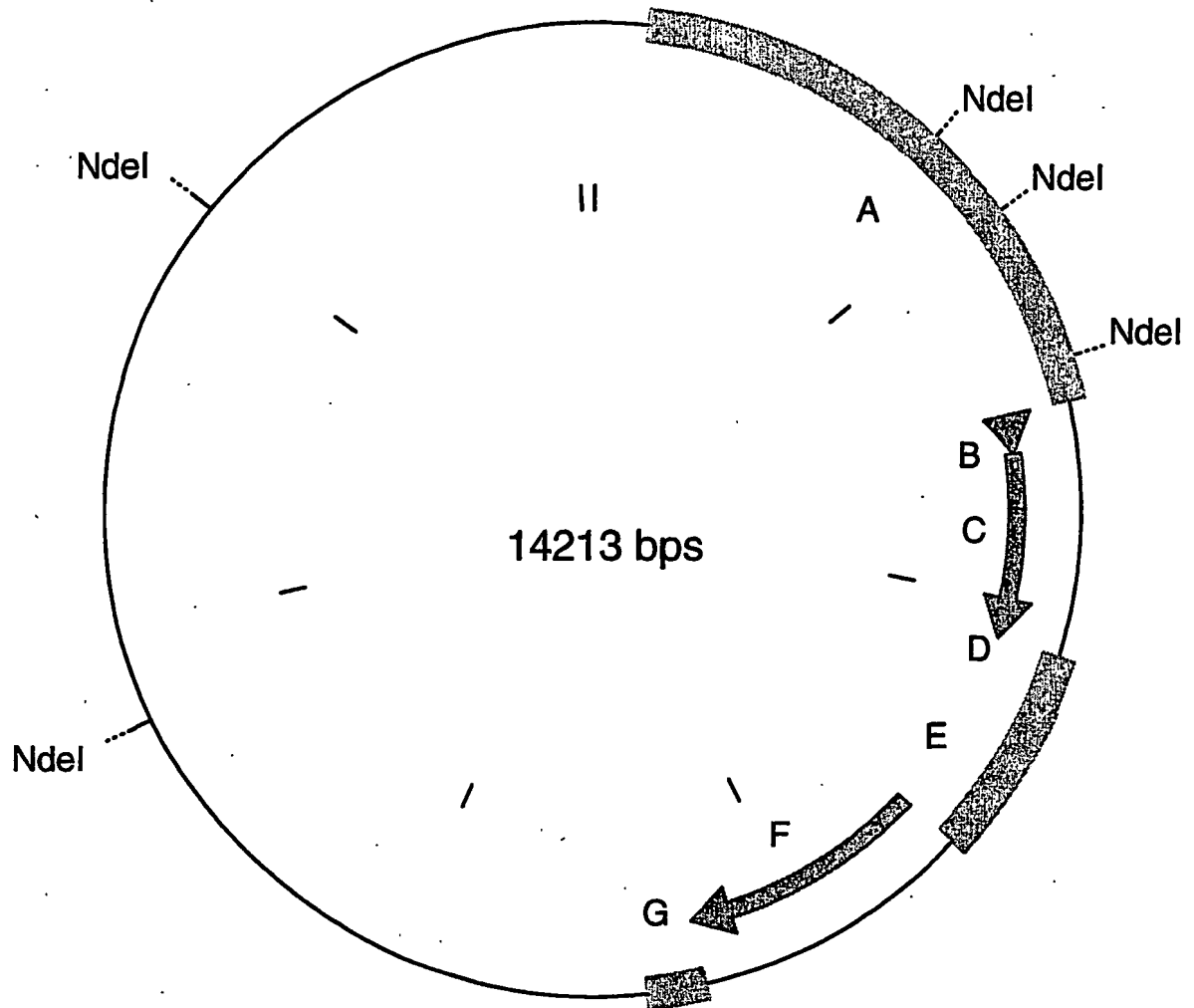
41/63

Abbildung 41: pSUN2-Leb4-IPP-SynCyc-nosT-USPP-AtTATase5-nosT

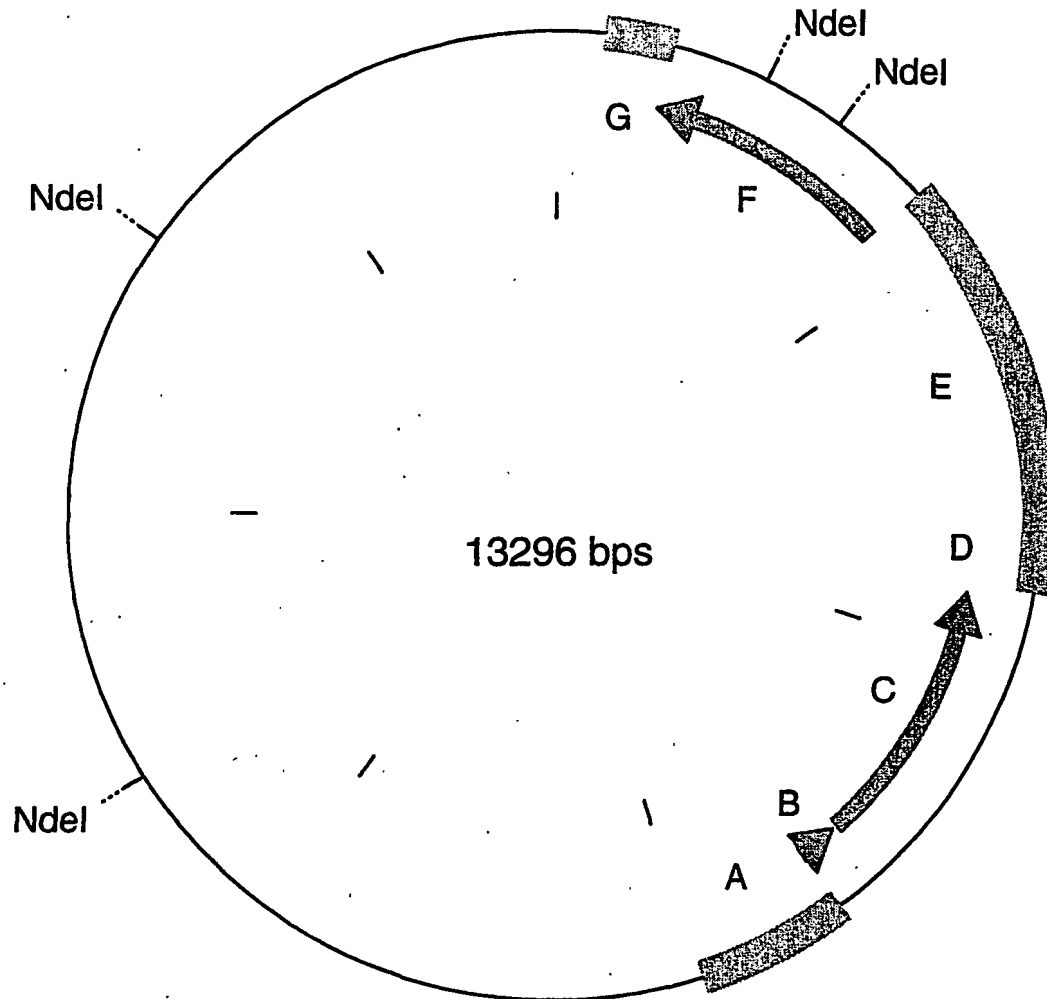


42/63

Abbildung 42: pSUN2-Leb4-IPP-SynCyc-nostT-USPP-AtTATase6-nost

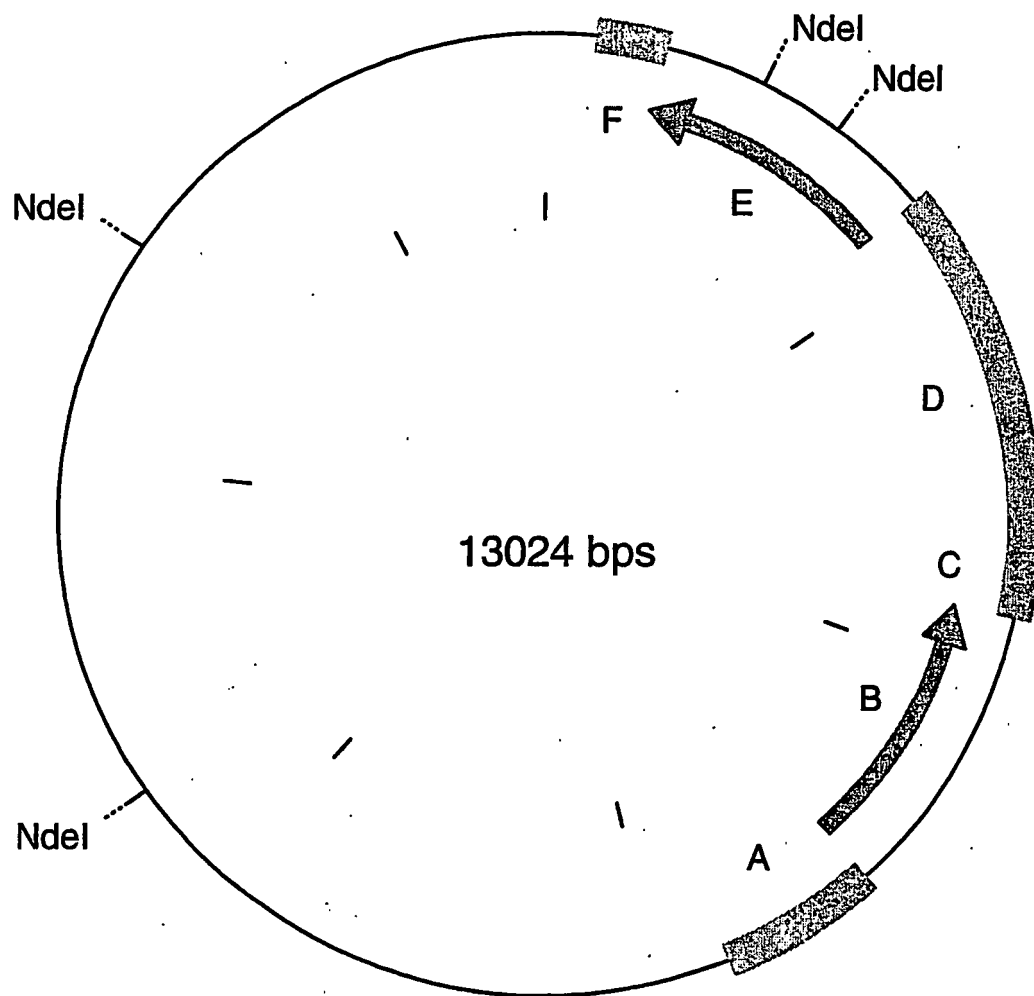


43/63

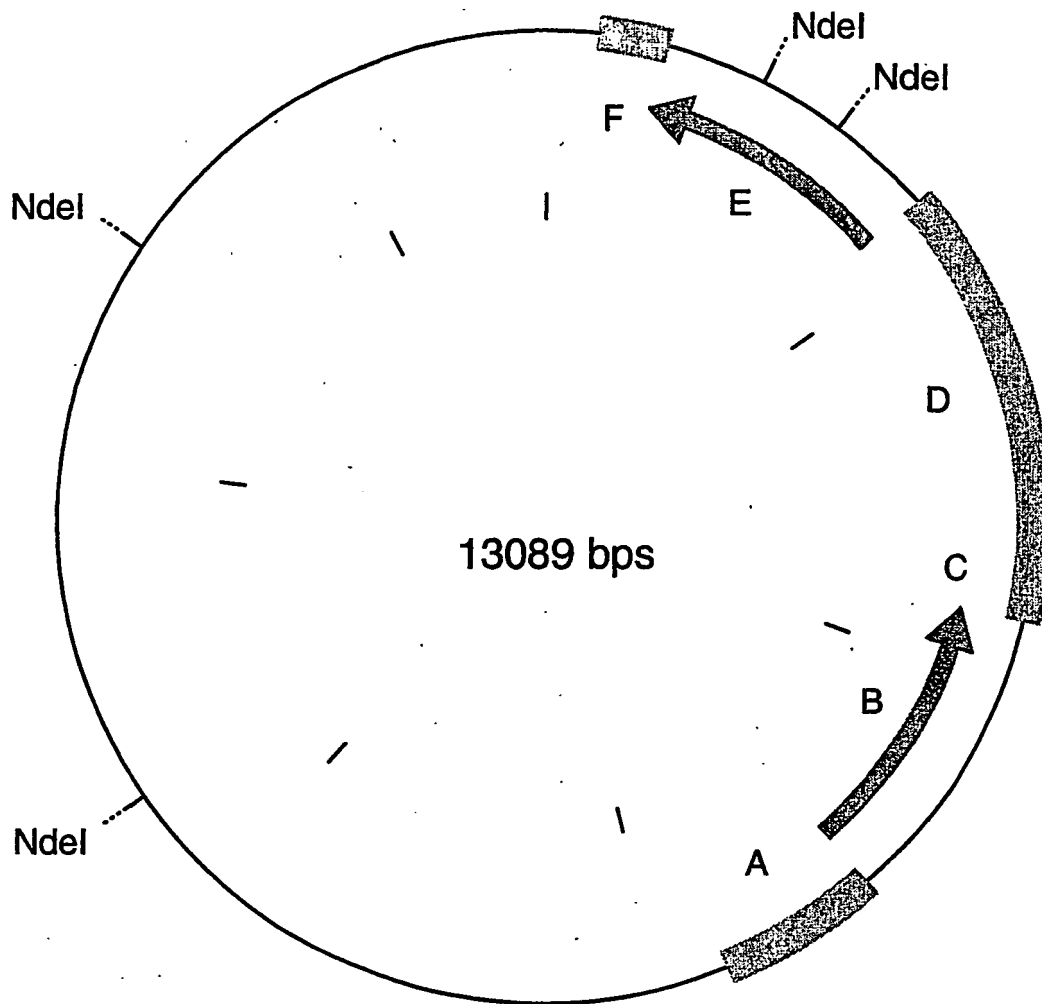
Abbildung 43: pSUN2-SBPP-At $\gamma$ TMT-nost-USPP-rbcS-RnTATase-nost

44/63

Abbildung 44: pSUN2-SBP-AtTMT-nost-USPP-AtTATase1-nost

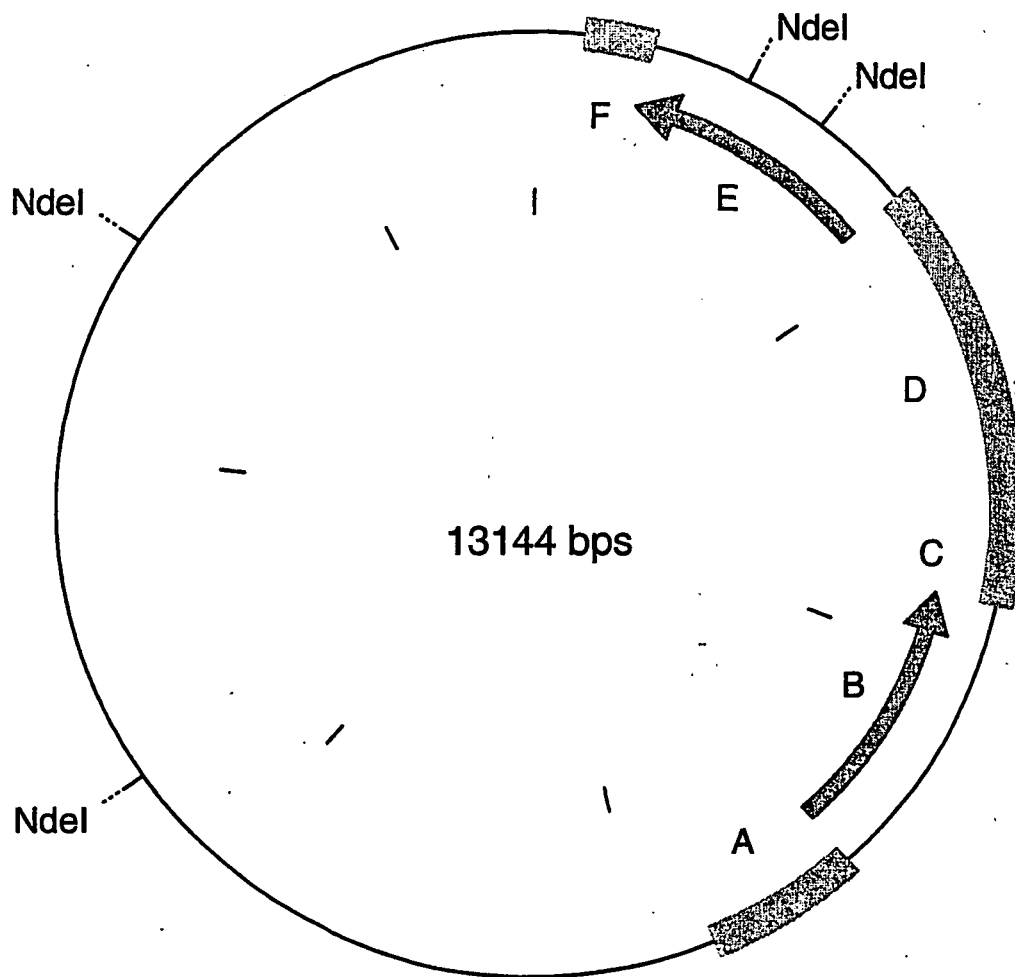


45/63

Abbildung 45: pSUN2-SBP-At $\gamma$ TMT-nosT-USPP-AtTATase3-nosT

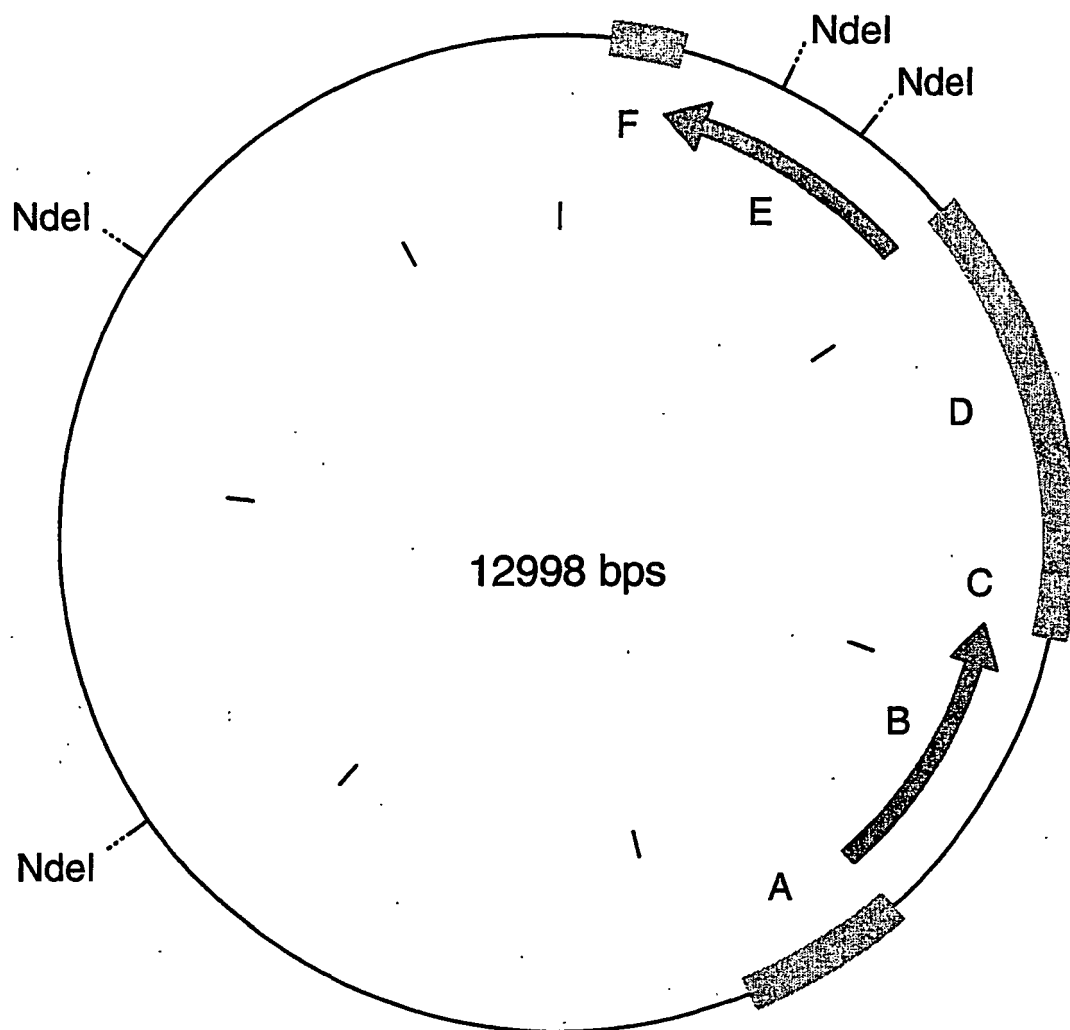
46/63

Abbildung 46: pSUN2-SBP-AtγTMT-nost-USPP-AtTATase5-nost



47/63

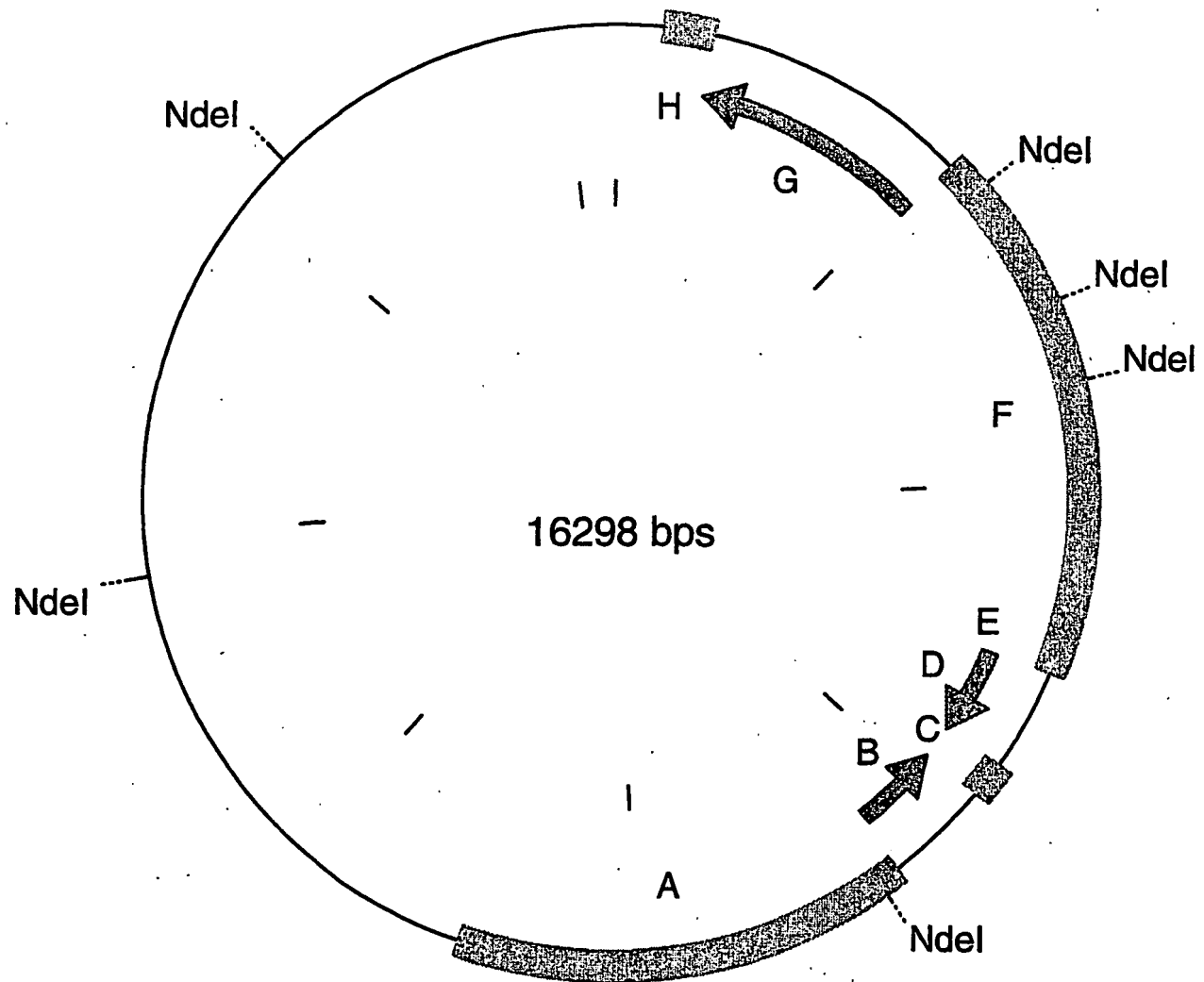
Abbildung 47: pSUN2-SBP-AtγTMT-nost-USPP-AtTATase6-nost





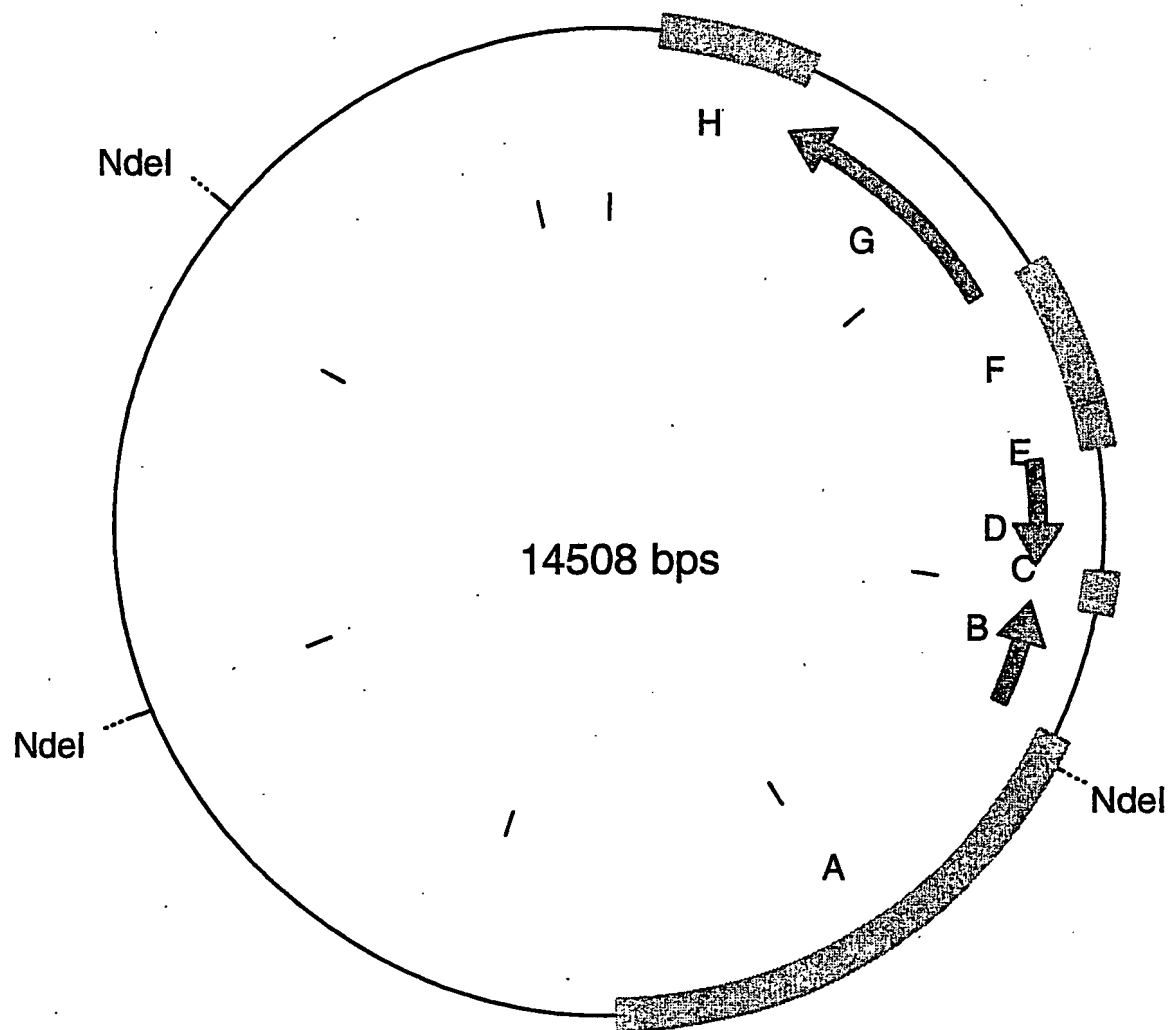
48/63

## Abbildung 48:

**pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocst-LeB4-NtGGPPOR-nost**

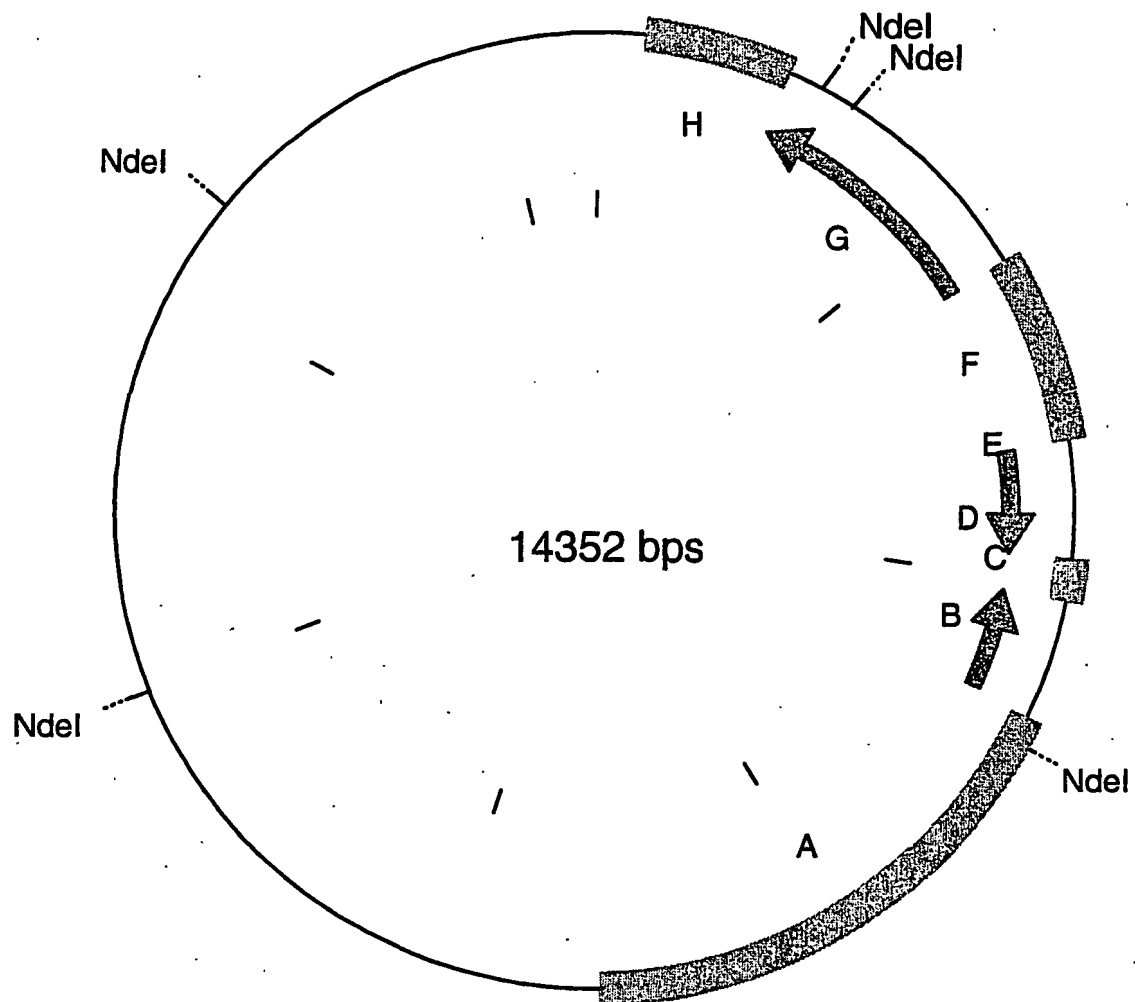
49/63

## Abbildung 49:

**pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocst-USPP-AtHPPD-ocst**

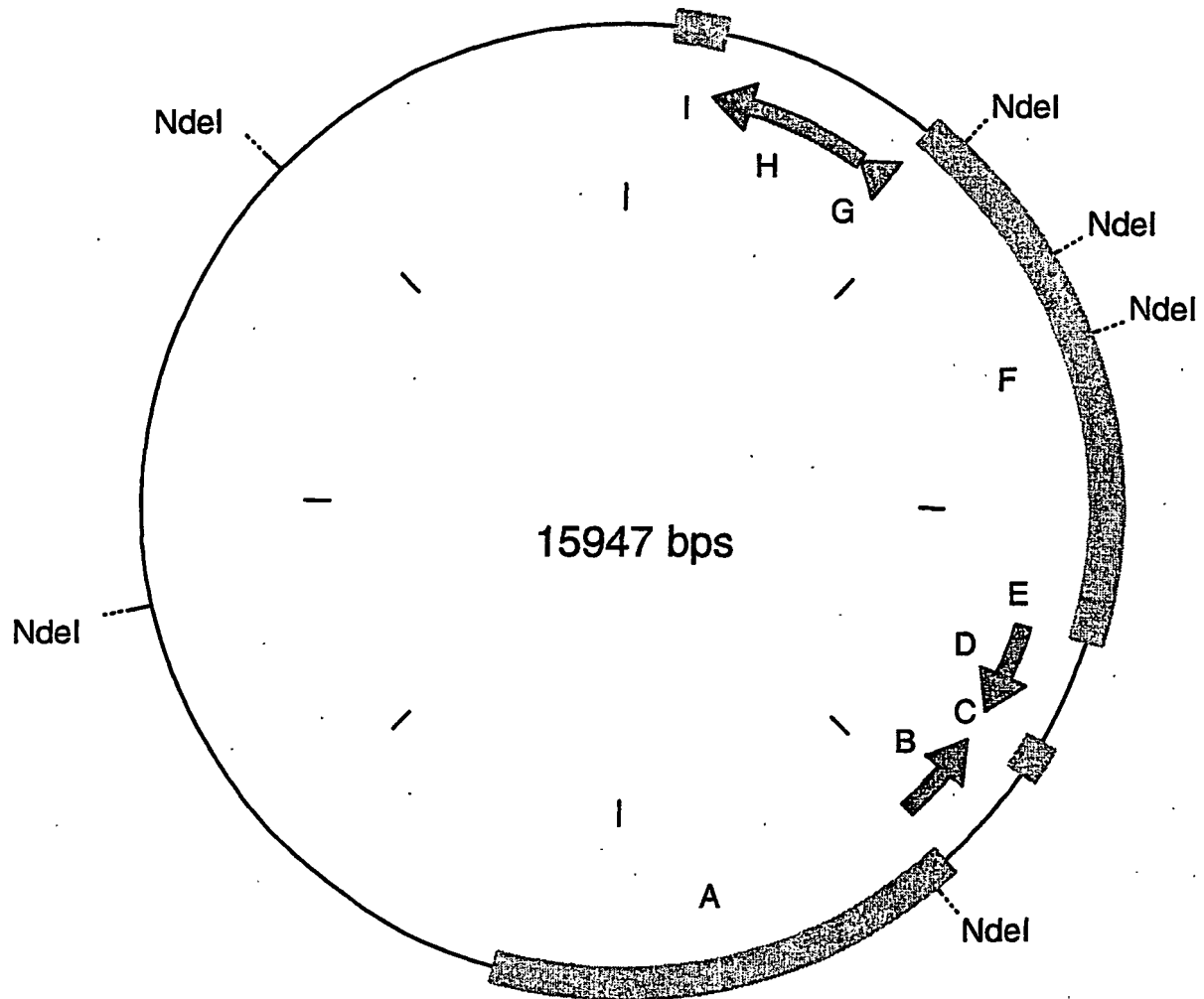
50/63

## Abbildung 50:

**pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocst-USPP-AtHPT-ocst**

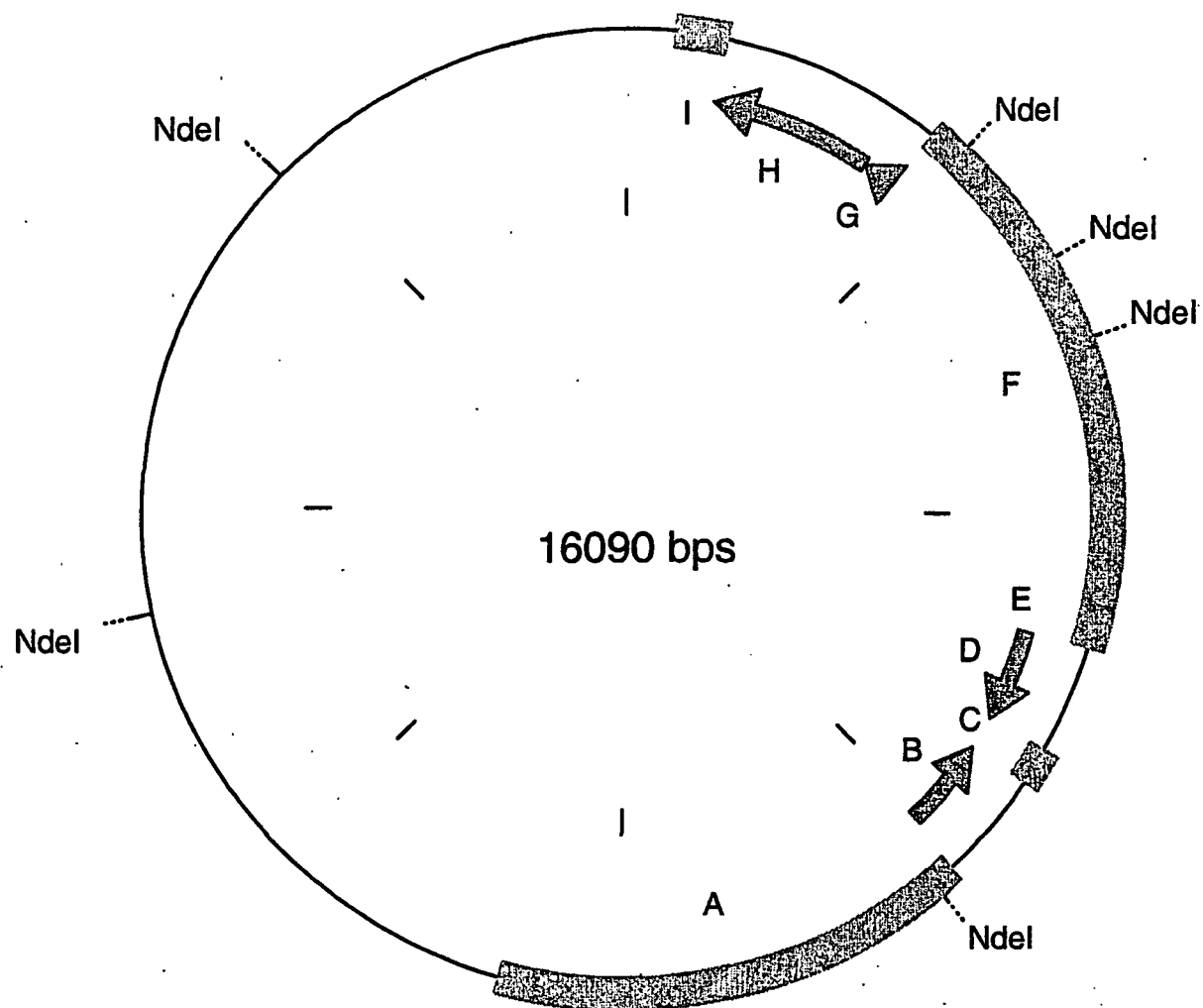
## Abbildung 51:

pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocst-LeB4-IPP-SynMT1-nost



## Abbildung 52:

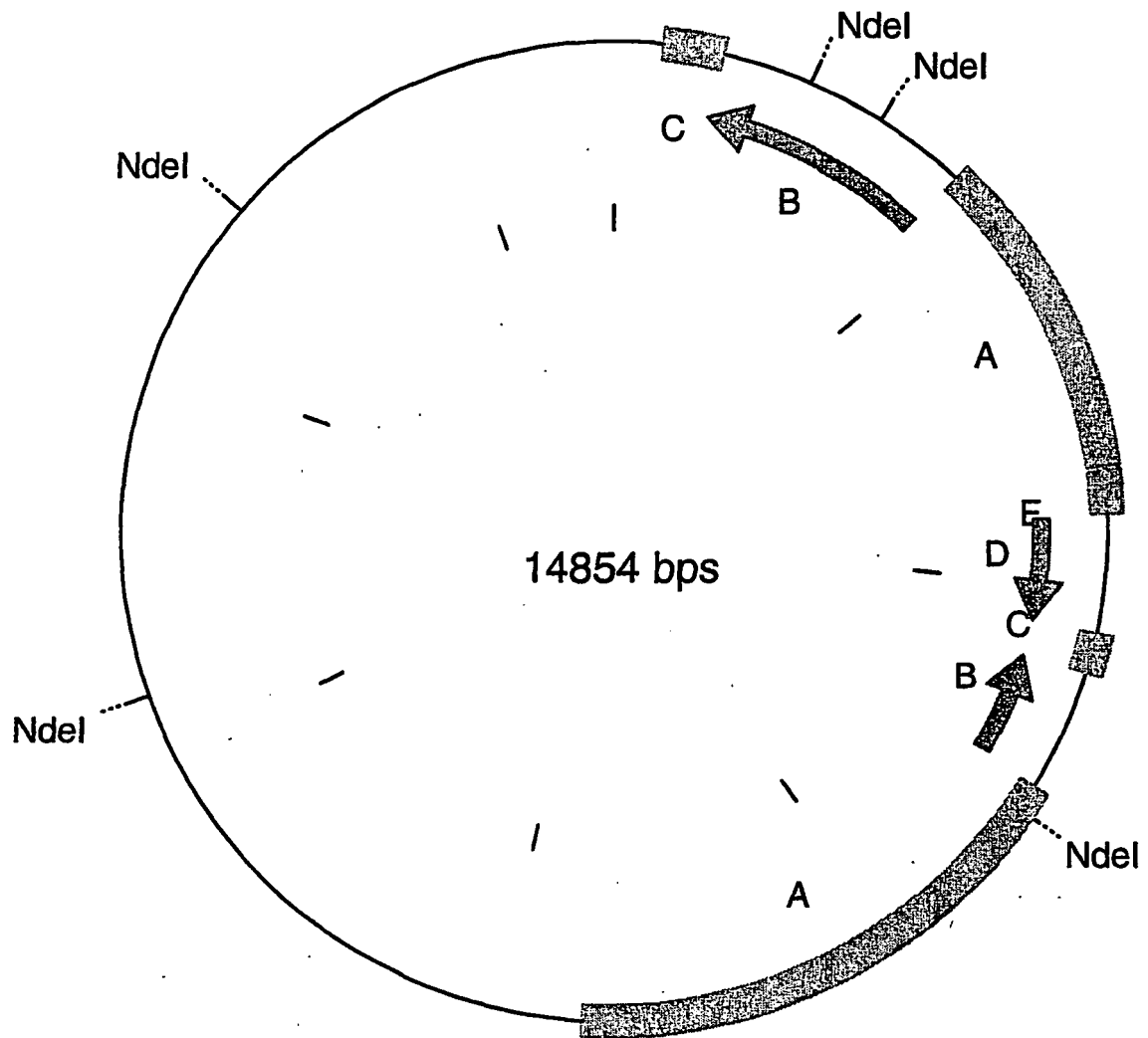
**pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT-LeB4-IPP-SynMT1-nost**



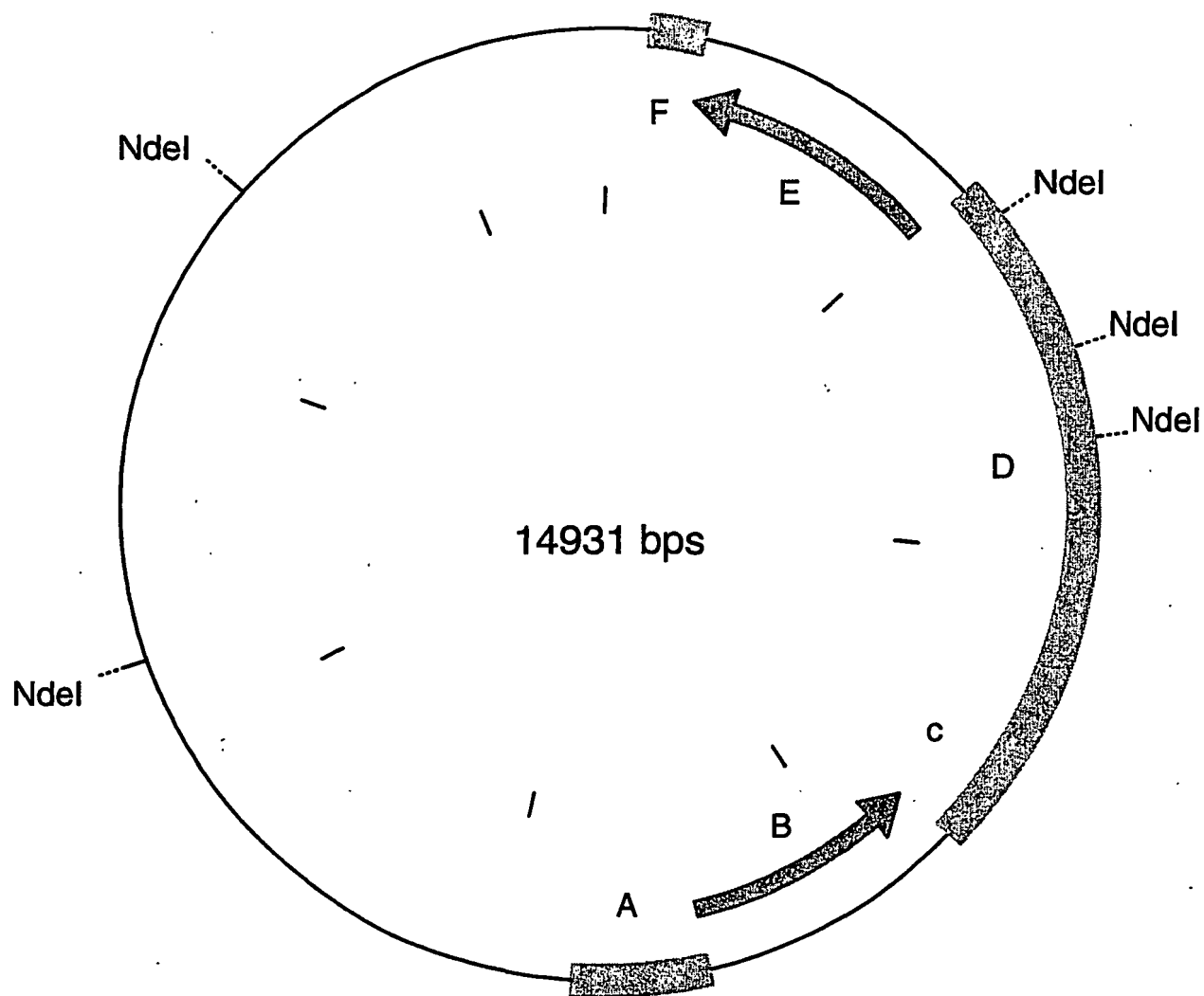
53/63

## Abbildung 53:

pSUN2-Pvic-\*BnHGD-STLS1- $\alpha$ \*BnHGD-ocsT-SBPP-At $\gamma$ TMT-35sT

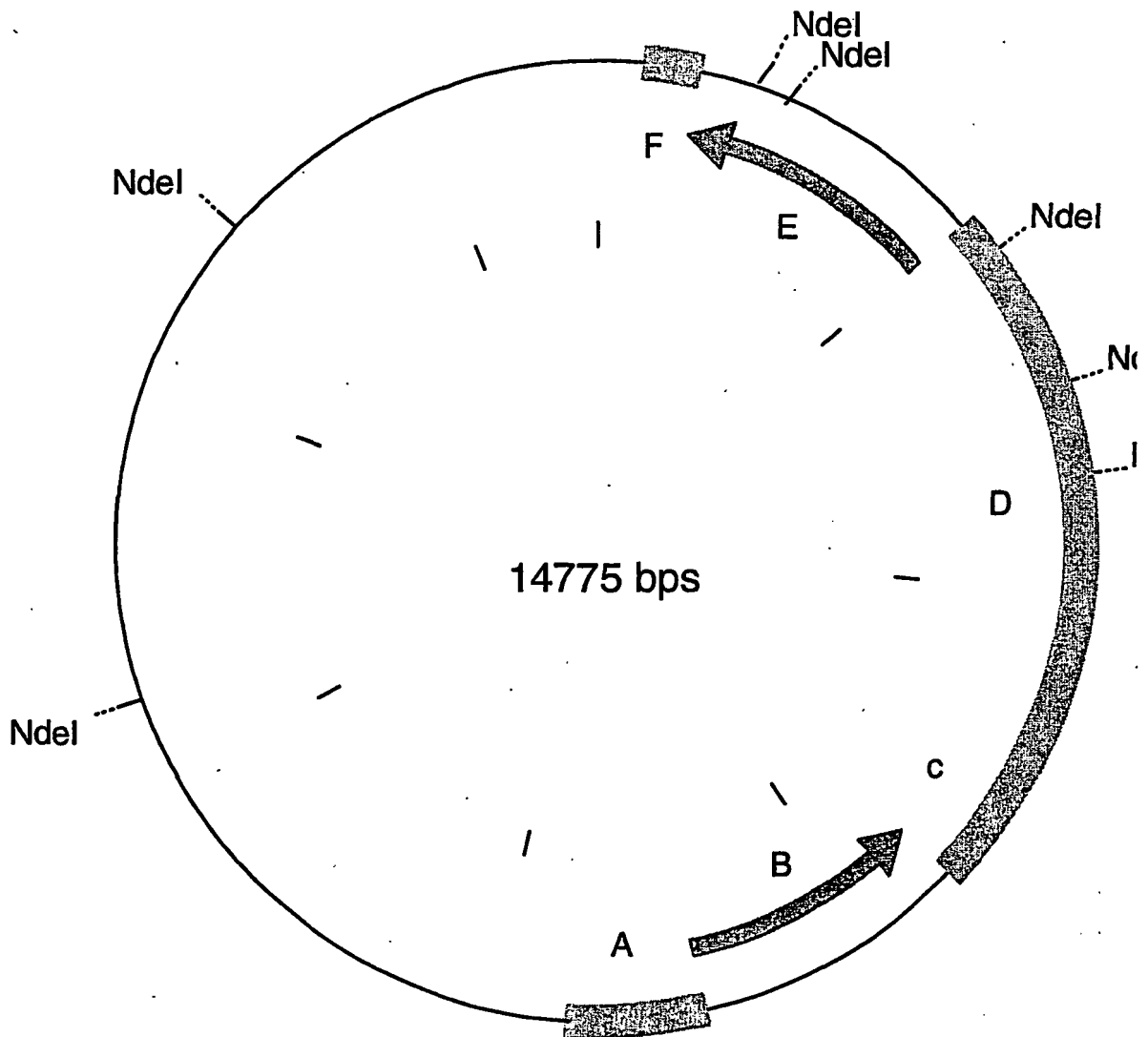


54/63

**Abbildung 54: pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nost-USPP-AthHPPD-ocsT**

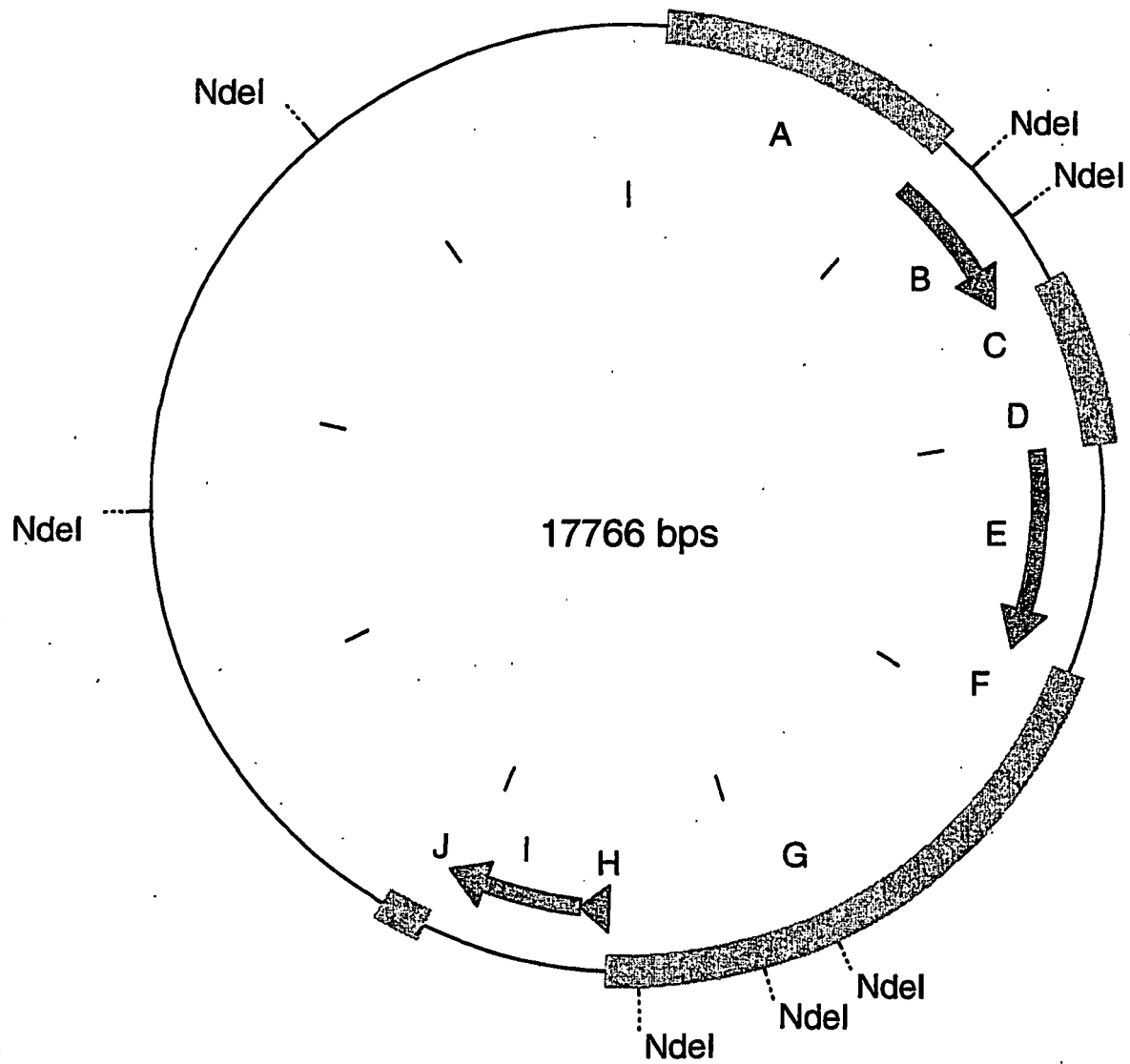
55/63

Abbildung 55: pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nost-USPP-AthHPT-ocsT





56/63

**Abbildung 56:****pSUN2-SBPP-AtgTMT-35sT-USPP-AtHPPD-ocsT-LeB-SynMT1-nost**

57/63

Abbildung 57:

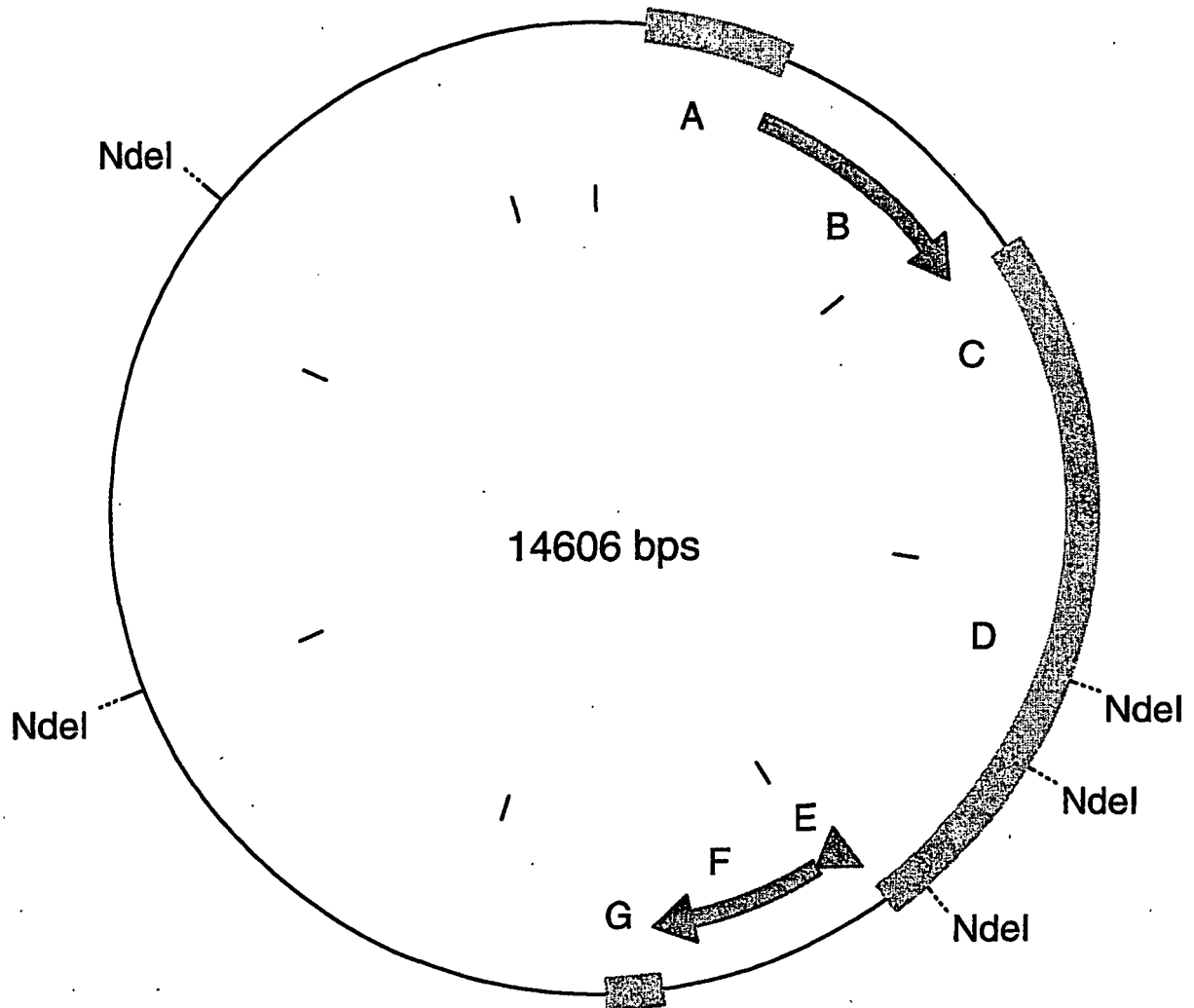
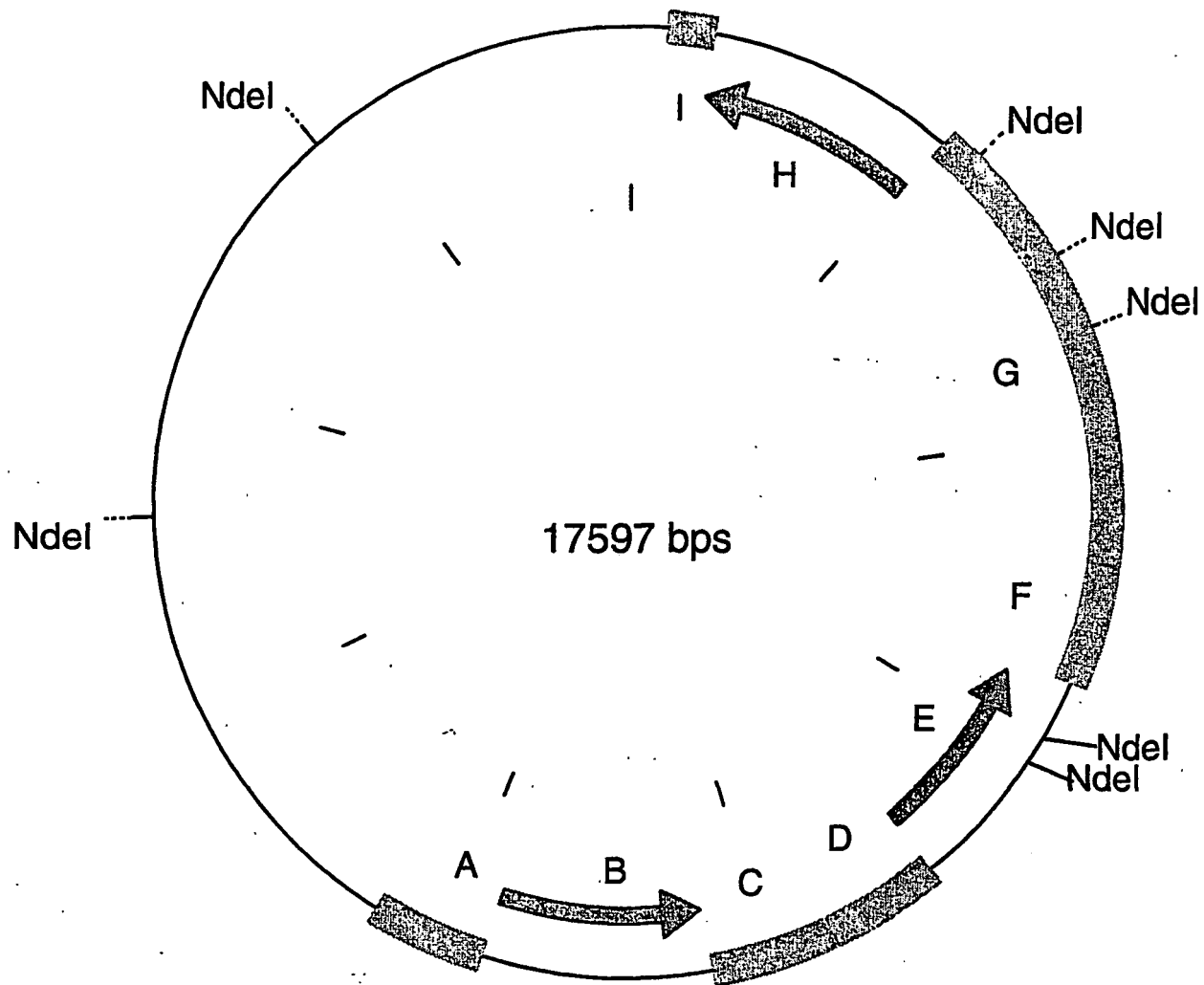
**pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT-LeB-SynMT1-nost**

Abbildung 58:

**pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT-USPP-AthHPPD-ocsT-USPP-AthHPT-ocsT**



**Abbildung 59:**

**pSUN2-SBP-AtyTMT-35sT-LeB4-IPP-SynCyc-nosT-LeB4-IPP-SynMT1-nosT**

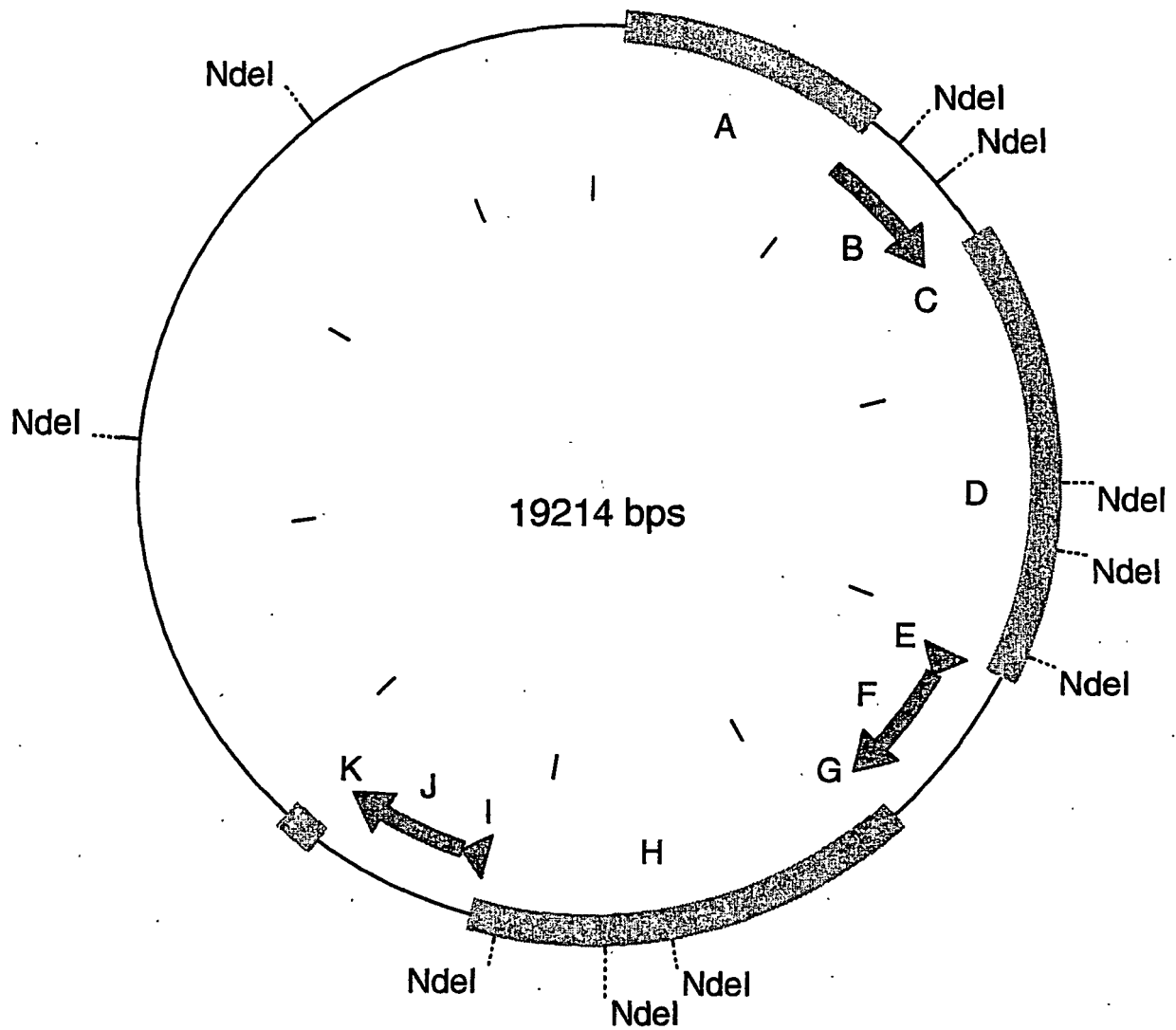
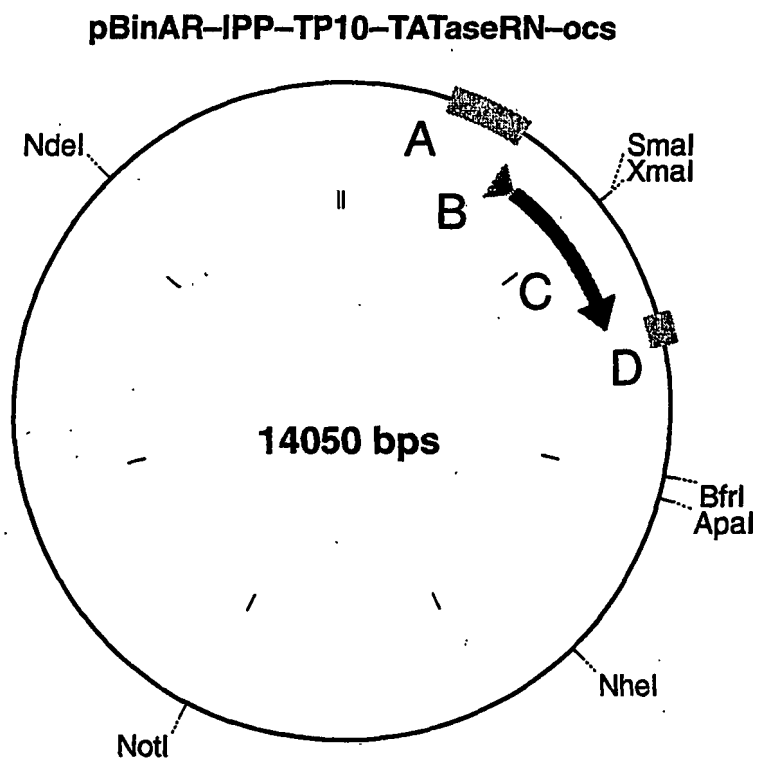
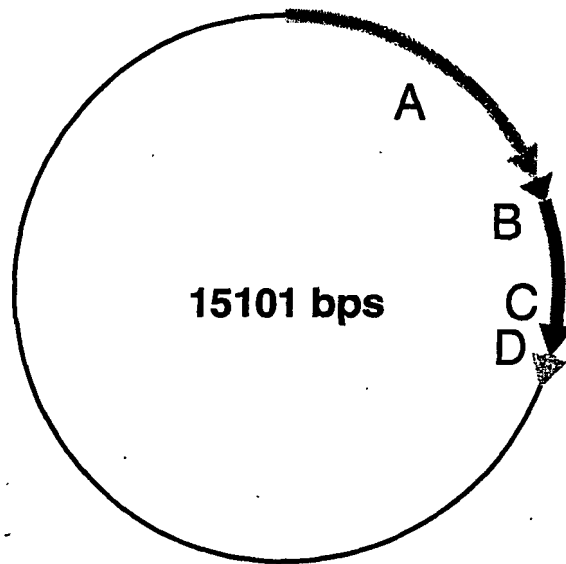


Abbildung 60



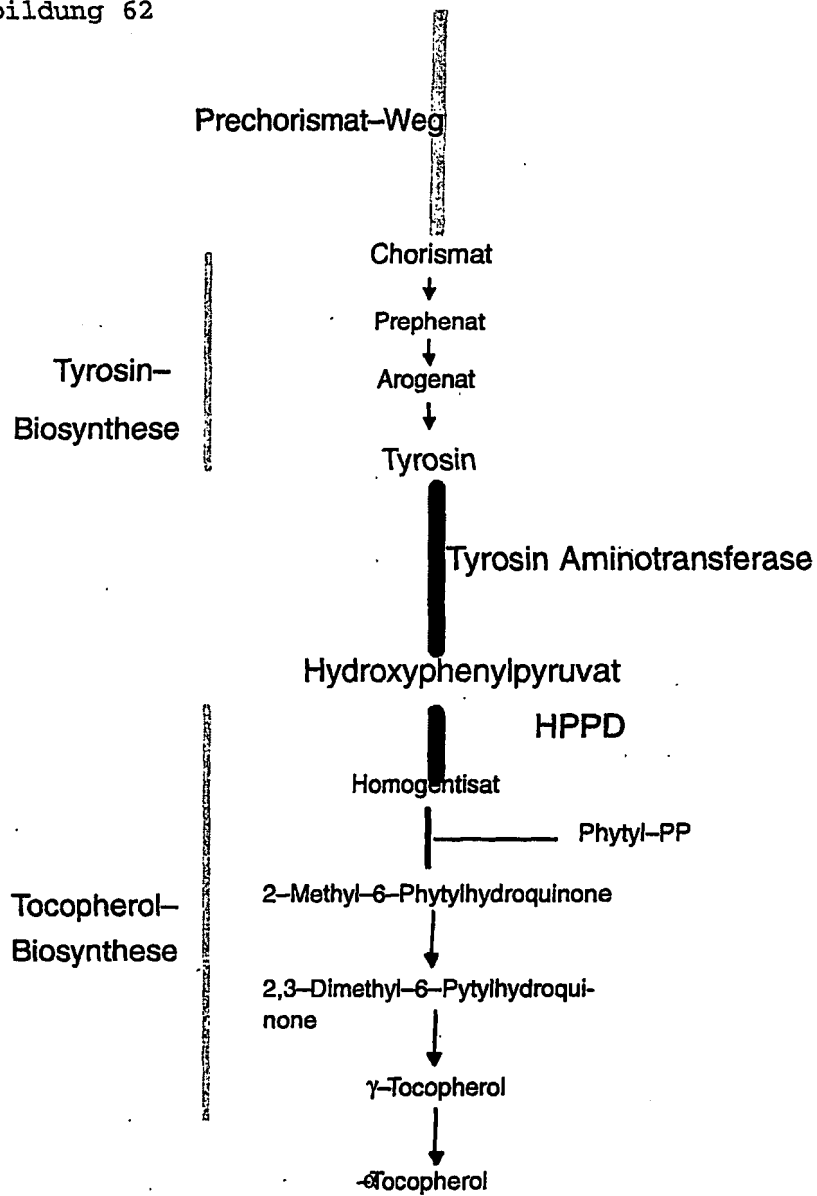
61/63

Abbildung 61:

**pPTVkanLeP-IPPTp11-TATaseRN**

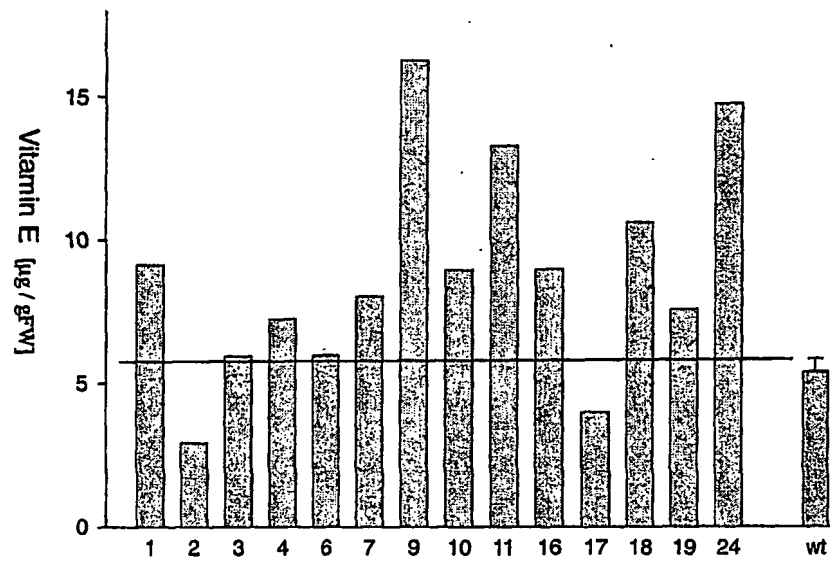
62/63

Abbildung 62



63/63

Abbildung 63





## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; SunGene GmbH &amp; Co. KGaA

<120> Erhöhung des Vitamin-E-Gehalts in Organismen durch  
Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität

&lt;130&gt; 0817/00021

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 58

&lt;170&gt; PatentIn Vers. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1377

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1371)

&lt;400&gt; 1

gat atc atg gac tcc tac gtg att cag acg gat gtc gac gac agc ttg	48
Asp Ile Met Asp Ser Tyr Val Ile Gln Thr Asp Val Asp Asp Ser Leu	
1 5 10 15	
tcc tca gtt ctg gat gtg cat gtc aat att ggt ggg aga aac tcg gta	96
Ser Ser Val Leu Asp Val His Val Asn Ile Gly Gly Arg Asn Ser Val	
20 25 30	
caa gga aga aag aaa ggc agg aag gcc aga tgg gac gtg aga ccc tct	144
Gln Gly Arg Lys Lys Gly Arg Lys Ala Arg Trp Asp Val Arg Pro Ser	
35 40 45	
gac atg tcc aat aag acc ttc aat ccc atc cga gcc atc gtg gac aac	192
Asp Met Ser Asn Lys Thr Phe Asn Pro Ile Arg Ala Ile Val Asp Asn	
50 55 60	
atg aag gtg cag ccc aat ccg aac aag acc gtg att tct ctg tca att	240
Met Lys Val Gln Pro Asn Pro Asn Lys Thr Val Ile Ser Leu Ser Ile	
65 70 75 80	
ggg gac cct act gtg ttt ggg aac ctg cct aca gac cct gaa gtt acc	288
Gly Asp Pro Thr Val Phe Gly Asn Leu Pro Thr Asp Pro Glu Val Thr	
85 90 95	

caa gcc atg aaa gat gcc ctg gac tcg ggg aag tac aat ggc tat gcc	336
Gln Ala Met Lys Asp Ala Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Asn Gly Tyr Ala	
100 105 110	
ccg tcc atc ggc tac cta tcc agt cgg gag gag gtc gct tct tac tac	384
Pro Ser Ile Gly Tyr Leu Ser Ser Arg Glu Glu Val Ala Ser Tyr Tyr	
115 120 125	
cac tgt cat gag gct cct ctg gaa gct aag gat gtc att ctg aca agc	432
His Cys His Glu Ala Pro Leu Glu Ala Lys Asp Val Ile Leu Thr Ser	
130 135 140	
ggc tgc agt cag gcc att gag cta tgt cta gct gtg ttg gcc aat cct	480
Gly Cys Ser Gln Ala Ile Glu Leu Cys Leu Ala Val Leu Ala Asn Pro	
145 150 155 160	
gga caa aac atc ctc att cca agg ccc ggg ttt tcc ctc tat agg act	528
Gly Gln Asn Ile Leu Ile Pro Arg Pro Gly Phe Ser Leu Tyr Arg Thr	
165 170 175	
ttg gct gag tct atg gga att gag gtc aag ctc tac aat ctc ctg cct	576
Leu Ala Glu Ser Met Gly Ile Glu Val Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Pro	
180 185 190	
gag aag tct tgg gaa att gac cta aaa caa ctg gaa tct ctg atc gat	624
Glu Lys Ser Trp Glu Ile Asp Leu Lys Gln Leu Glu Ser Leu Ile Asp	
195 200 205	
gaa aaa aca gcg tgt ctt gtt gtc aac aac cca tcc aat ccc tgt ggc	672
Glu Lys Thr Ala Cys Leu Val Val Asn Asn Pro Ser Asn Pro Cys Gly	
210 215 220	
tcc gtg ttc agt aag cga cac ctt cag aag att ttg gca gtg gct gaa	720
Ser Val Phe Ser Lys Arg His Leu Gln Lys Ile Leu Ala Val Ala Glu	
225 230 235 240	
agg cag tgt gtc ccc atc tta gct gac gag atc tat ggt gac atg gtg	768
Arg Gln Cys Val Pro Ile Leu Ala Asp Glu Ile Tyr Gly Asp Met Val	
245 250 255	
ttt tca gat tgc aaa tac gaa cca ctg gcc aac ctc agc acc aat gtt	816
Phe Ser Asp Cys Lys Tyr Glu Pro Leu Ala Asn Leu Ser Thr Asn Val	
260 265 270	
ccc atc ctg tcc tgt ggt ggg ctg gcc aag cgc tgg ctg gtt cct ggc	864
Pro Ile Leu Ser Cys Gly Gly Leu Ala Lys Arg Trp Leu Val Pro Gly	
275 280 285	
tgg agg ttg ggc tgg atc ctc att cat gat cga aga gac att ttt ggc	912
Trp Arg Leu Gly Trp Ile Leu Ile His Asp Arg Arg Asp Ile Phe Gly	

290	295	300	
aat gag att cga gac ggg ctg gtg aaa ctg agt cag cgg atc ctg gga			960
Asn Glu Ile Arg Asp Gly Leu Val Lys Leu Ser Gln Arg Ile Leu Gly			
305	310	315	320
cca tgc acc ata gtc cag ggt gct ctg aag agc atc ctt cag cga acc			1008
Pro Cys Thr Ile Val Gln Gly Ala Leu Lys Ser Ile Leu Gln Arg Thr			
	325	330	335
cct cag gag ttc tat cac gac acg tta agc ttc ctc aag tcc aat gcg			1056
Pro Gln Glu Phe Tyr His Asp Thr Leu Ser Phe Leu Lys Ser Asn Ala			
	340	345	350
gac ctc tgc tat ggg gca ctg gct gcc atc cct gga ctc cag ccg gtc			1104
Asp Leu Cys Tyr Gly Ala Leu Ala Ala Ile Pro Gly Leu Gln Pro Val			
	355	360	365
cgc cct tct gga gcc atg tac ctt atg gtg gga att gag atg gag cat			1152
Arg Pro Ser Gly Ala Met Tyr Leu Met Val Gly Ile Glu Met Glu His			
	370	375	380
ttc ccg gaa ttc gag aac gac gtg gag ttc aca gag cgg ttg att gcg			1200
Phe Pro Glu Phe Glu Asn Asp Val Glu Phe Thr Glu Arg Leu Ile Ala			
385	390	395	400
gag cag gct gtc cac tgt ctc cca gca acg tgc ttc gag tac cca aat			1248
Glu Gln Ala Val His Cys Leu Pro Ala Thr Cys Phe Glu Tyr Pro Asn			
	405	410	415
ttc ttc cga gtg gtc atc aca gtc ccc gag gtg atg atg ctg gag gct			1296
Phe Phe Arg Val Val Ile Thr Val Pro Glu Val Met Met Leu Glu Ala			
	420	425	430
tgt agc cgg atc cag gag ttc tgt gaa cag cac tac cac tgt gct gaa			1344
Cys Ser Arg Ile Gln Glu Phe Cys Glu Gln His Tyr His Cys Ala Glu			
	435	440	445
ggc agc cag gag gag tgt gac aaa taa gatatc			1377
Gly Ser Gln Glu Glu Cys Asp Lys			
450	455		

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 456

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 2

Asp Ile Met Asp Ser Tyr Val Ile Gln Thr Asp Val Asp Asp Ser Leu

1	5	10	15
Ser Ser Val Leu Asp Val His Val Asn Ile Gly Gly Arg Asn Ser Val	20	25	30
Gln Gly Arg Lys Lys Gly Arg Lys Ala Arg Trp Asp Val Arg Pro Ser	35	40	45
Asp Met Ser Asn Lys Thr Phe Asn Pro Ile Arg Ala Ile Val Asp Asn	50	55	60
Met Lys Val Gln Pro Asn Pro Asn Lys Thr Val Ile Ser Leu Ser Ile	65	70	75
Gly Asp Pro Thr Val Phe Gly Asn Leu Pro Thr Asp Pro Glu Val Thr	85	90	95
Gln Ala Met Lys Asp Ala Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Asn Gly Tyr Ala	100	105	110
Pro Ser Ile Gly Tyr Leu Ser Ser Arg Glu Glu Val Ala Ser Tyr Tyr	115	120	125
His Cys His Glu Ala Pro Leu Glu Ala Lys Asp Val Ile Leu Thr Ser	130	135	140
Gly Cys Ser Gln Ala Ile Glu Leu Cys Leu Ala Val Leu Ala Asn Pro	145	150	155
Gly Gln Asn Ile Leu Ile Pro Arg Pro Gly Phe Ser Leu Tyr Arg Thr	165	170	175
Leu Ala Glu Ser Met Gly Ile Glu Val Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Pro	180	185	190
Glu Lys Ser Trp Glu Ile Asp Leu Lys Gln Leu Glu Ser Leu Ile Asp	195	200	205
Glu Lys Thr Ala Cys Leu Val Val Asn Asn Pro Ser Asn Pro Cys Gly	210	215	220
Ser Val Phe Ser Lys Arg His Leu Gln Lys Ile Leu Ala Val Ala Glu	225	230	235
Arg Gln Cys Val Pro Ile Leu Ala Asp Glu Ile Tyr Gly Asp Met Val	245	250	255
Phe Ser Asp Cys Lys Tyr Glu Pro Leu Ala Asn Leu Ser Thr Asn Val	260	265	270

Pro Ile Leu Ser Cys Gly Gly Leu Ala Lys Arg Trp Leu Val Pro Gly  
 275 280 285

Trp Arg Leu Gly Trp Ile Leu Ile His Asp Arg Arg Asp Ile Phe Gly  
 290 295 300

Asn Glu Ile Arg Asp Gly Leu Val Lys Leu Ser Gln Arg Ile Leu Gly  
 305 310 315 320

Pro Cys Thr Ile Val Gln Gly Ala Leu Lys Ser Ile Leu Gln Arg Thr  
 325 330 335

Pro Gln Glu Phe Tyr His Asp Thr Leu Ser Phe Leu Lys Ser Asn Ala  
 340 345 350

Asp Leu Cys Tyr Gly Ala Leu Ala Ala Ile Pro Gly Leu Gln Pro Val  
 355 360 365

Arg Pro Ser Gly Ala Met Tyr Leu Met Val Gly Ile Glu Met Glu His  
 370 375 380

Phe Pro Glu Phe Glu Asn Asp Val Glu Phe Thr Glu Arg Leu Ile Ala  
 385 390 395 400

Glu Gln Ala Val His Cys Leu Pro Ala Thr Cys Phe Glu Tyr Pro Asn  
 405 410 415

Phe Phe Arg Val Val Ile Thr Val Pro Glu Val Met Met Leu Glu Ala  
 420 425 430

Cys Ser Arg Ile Gln Glu Phe Cys Glu Gln His Tyr His Cys Ala Glu  
 435 440 445

Gly Ser Gln Glu Glu Cys Asp Lys  
 450 455

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1365

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1365)

&lt;400&gt; 3

atg gac tcc tac gtg att cag acg gat gtc gac gac agc ttg tcc tca 48  
 Met Asp Ser Tyr Val Ile Gln Thr Asp Val Asp Asp Ser Leu Ser Ser  
 1 5 10 15

gtt ctg gat gtg cgt gtc aat gtt ggt ggg aga aac tcg gta caa gga	96
Val Leu Asp Val Arg Val Asn Val Gly Gly Arg Asn Ser Val Gln Gly	
20 25 30	
aga aag aaa ggc agg aag gcc aga tgg gac gtg aga ccc tct gac atg	144
Arg Lys Lys Gly Arg Lys Ala Arg Trp Asp Val Arg Pro Ser Asp Met	
35 40 45	
tcc aat aag acc ttc aat ccc atc cga gcc atc gtg gac aac atg aag	192
Ser Asn Lys Thr Phe Asn Pro Ile Arg Ala Ile Val Asp Asn Met Lys	
50 55 60	
gtg cag ccc aat ccg aac aag acc gtg att tct ctg tca att ggg gac	240
Val Gln Pro Asn Pro Asn Lys Thr Val Ile Ser Leu Ser Ile Gly Asp	
65 70 75 80	
cct act gtg ttt ggg aac ctg cct aca gac cct gaa gtt acc caa gcc	288
Pro Thr Val Phe Gly Asn Leu Pro Thr Asp Pro Glu Val Thr Gln Ala	
85 90 95	
atg aaa gat gcc ctg gac tcg ggg aag tac aat ggc tat gcc ccg tcc	336
Met Lys Asp Ala Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Asn Gly Tyr Ala Pro Ser	
100 105 110	
atc ggc tac cta tcc agt cgg gag gag gtc gct tct tac tac cac tgt	384
Ile Gly Tyr Leu Ser Ser Arg Glu Glu Val Ala Ser Tyr Tyr His Cys	
115 120 125	
cat gag gct cct ctg gaa gct aag gat gtc att ctg aca agc ggc tgc	432
His Glu Ala Pro Leu Glu Ala Lys Asp Val Ile Leu Thr Ser Gly Cys	
130 135 140	
agt cag gcc att gag cta tgt cta gct gtg ttg gcc aat cct gga caa	480
Ser Gln Ala Ile Glu Leu Cys Leu Ala Val Leu Ala Asn Pro Gly Gln	
145 150 155 160	
aac atc ctc att cca agg ccc ggg ttt tcc ctc tat agg act ttg gct	528
Asn Ile Leu Ile Pro Arg Pro Gly Phe Ser Leu Tyr Arg Thr Leu Ala	
165 170 175	
gag tct atg gga att gag gtc aag ctc tac aat ctc ctg ccc gag aag	576
Glu Ser Met Gly Ile Glu Val Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Pro Glu Lys	
180 185 190	
tct tgg gaa att gac cta aaa caa ctg gaa tct ctg atc gat gaa aaa	624
Ser Trp Glu Ile Asp Leu Lys Gln Leu Glu Ser Leu Ile Asp Glu Lys	
195 200 205	
aca gcg tgt ctt gtt gtc aac aac cca tcc aat ccc tgt ggc tcc gtg	672

Thr	Ala	Cys	Leu	Val	Val	Asn	Asn	Pro	Ser	Asn	Pro	Cys	Gly	Ser	Val		
210						215					220						
ttc	agt	aag	cgg	cac	ctt	cag	aag	att	ttg	gca	gtg	gct	gaa	agg	cag	720	
Phe	Ser	Lys	Arg	His	Leu	Gln	Lys	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Glu	Arg	Gln		
225					230					235					240		
tgt	gtc	ccc	atc	tta	gct	gac	gag	atc	tat	ggg	gac	atg	gtg	ttt	tca	768	
Cys	Val	Pro	Ile	Leu	Ala	Asp	Glu	Ile	Tyr	Gly	Asp	Met	Val	Phe	Ser		
				245					250					255			
gac	tgc	aaa	tac	gaa	cca	ctg	gcc	aac	ctc	agc	acc	aat	gtt	ccc	atc	816	
Asp	Cys	Lys	Tyr	Glu	Pro	Leu	Ala	Asn	Leu	Ser	Thr	Asn	Val	Pro	Ile		
			260					265					270				
ctg	tcc	tgt	ggg	ctg	gcc	aag	cgc	tgg	ctg	gtt	cct	ggc	tgg	agg		864	
Leu	Ser	Cys	Gly	Gly	Leu	Ala	Lys	Arg	Trp	Leu	Val	Pro	Gly	Trp	Arg		
		275					280					285					
ttg	ggc	tgg	atc	ctc	att	cat	gat	cga	aga	gac	att	ttt	ggc	aat	gag	912	
Leu	Gly	Trp	Ile	Leu	Ile	His	Asp	Arg	Arg	Asp	Ile	Phe	Gly	Asn	Glu		
	290					295					300						
att	cga	gac	ggg	ctg	gtg	aaa	ctg	agt	cag	cgg	atc	ctg	gga	cca	tgc	960	
Ile	Arg	Asp	Gly	Leu	Val	Lys	Leu	Ser	Gln	Arg	Ile	Leu	Gly	Pro	Cys		
305					310					315					320		
acc	ata	gtc	cag	ggg	gct	ctg	aag	agc	atc	ctt	cag	cga	acc	cct	cag	1008	
Thr	Ile	Val	Gln	Gly	Ala	Leu	Lys	Ser	Ile	Leu	Gln	Arg	Thr	Pro	Gln		
				325					330					335			
gag	ttc	tat	cac	gac	acg	tta	agc	ttc	ctc	aag	tcc	aat	gcg	gac	ctc	1056	
Glu	Phe	Tyr	His	Asp	Thr	Leu	Ser	Phe	Leu	Lys	Ser	Asn	Ala	Asp	Leu		
			340					345					350				
tgc	tat	ggg	gca	ctg	gct	gcc	atc	cct	gga	ctc	cag	ccg	gtc	cgc	cct	1104	
Cys	Tyr	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Ile	Pro	Gly	Leu	Gln	Pro	Val	Arg	Pro		
		355				360					365						
tct	gga	gcc	atg	tac	ctt	atg	gtg	gga	att	gag	atg	gag	cat	ctc	ccg	1152	
Ser	Gly	Ala	Met	Tyr	Leu	Met	Val	Gly	Ile	Glu	Met	Glu	His	Leu	Pro		
	370					375					380						
gaa	ttc	gag	aac	gac	gtg	gag	ttc	aca	gag	cgg	ttg	att	gcg	gag	cag	1200	
Glu	Phe	Glu	Asn	Asp	Val	Glu	Phe	Thr	Glu	Arg	Leu	Ile	Ala	Glu	Gln		
385					390					395					400		
gct	gtc	cac	tgt	ctc	cca	gca	acg	tgc	ttc	gag	tac	cca	aat	ttc	ttc	1248	
Ala	Val	His	Cys	Leu	Pro	Ala	Thr	Cys	Phe	Glu	Tyr	Pro	Asn	Phe	Phe		
				405				410						415			

cga gtg gtc atc aca gtc ccc gag gtg atg atg ctg gag gct tgt agc 1296  
 Arg Val Val Ile Thr Val Pro Glu Val Met Met Leu Glu Ala Cys Ser  
                   420                  425                  430

cgg atc cag gag ttc tgt gaa cag cac tac cac tgt gct gaa ggc agc 1344  
 Arg Ile Gln Glu Phe Cys Glu Gln His Tyr His Cys Ala Glu Gly Ser  
                   435                  440                  445

cag gag gag tgt gac aaa taa 1365  
 Gln Glu Glu Cys Asp Lys  
                   450                  455

<210> 4

<211> 454

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

Met Asp Ser Tyr Val Ile Gln Thr Asp Val Asp Asp Ser Leu Ser Ser  
           1                  5                  10                  15

Val Leu Asp Val Arg Val Asn Val Gly Gly Arg Asn Ser Val Gln Gly  
                   20                  25                  30

Arg Lys Lys Gly Arg Lys Ala Arg Trp Asp Val Arg Pro Ser Asp Met  
                   35                  40                  45

Ser Asn Lys Thr Phe Asn Pro Ile Arg Ala Ile Val Asp Asn Met Lys  
           50                  55                  60

Val Gln Pro Asn Pro Asn Lys Thr Val Ile Ser Leu Ser Ile Gly Asp  
           65                  70                  75                  80

Pro Thr Val Phe Gly Asn Leu Pro Thr Asp Pro Glu Val Thr Gln Ala  
                   85                  90                  95

Met Lys Asp Ala Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Asn Gly Tyr Ala Pro Ser  
                   100                  105                  110

Ile Gly Tyr Leu Ser Ser Arg Glu Glu Val Ala Ser Tyr Tyr His Cys  
                   115                  120                  125

His Glu Ala Pro Leu Glu Ala Lys Asp Val Ile Leu Thr Ser Gly Cys  
           130                  135                  140

Ser Gln Ala Ile Glu Leu Cys Leu Ala Val Leu Ala Asn Pro Gly Gln  
           145                  150                  155                  160



Asn Ile Leu Ile Pro Arg Pro Gly Phe Ser Leu Tyr Arg Thr Leu Ala  
 165 170 175

Glu Ser Met Gly Ile Glu Val Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Pro Glu Lys  
 180 185 190

Ser Trp Glu Ile Asp Leu Lys Gln Leu Glu Ser Leu Ile Asp Glu Lys  
 195 200 205

Thr Ala Cys Leu Val Val Asn Asn Pro Ser Asn Pro Cys Gly Ser Val  
 210 215 220

Phe Ser Lys Arg His Leu Gln Lys Ile Leu Ala Val Ala Glu Arg Gln  
 225 230 235 240

Cys Val Pro Ile Leu Ala Asp Glu Ile Tyr Gly Asp Met Val Phe Ser  
 245 250 255

Asp Cys Lys Tyr Glu Pro Leu Ala Asn Leu Ser Thr Asn Val Pro Ile  
 260 265 270

Leu Ser Cys Gly Gly Leu Ala Lys Arg Trp Leu Val Pro Gly Trp Arg  
 275 280 285

Leu Gly Trp Ile Leu Ile His Asp Arg Arg Asp Ile Phe Gly Asn Glu  
 290 295 300

Ile Arg Asp Gly Leu Val Lys Leu Ser Gln Arg Ile Leu Gly Pro Cys  
 305 310 315 320

Thr Ile Val Gln Gly Ala Leu Lys Ser Ile Leu Gln Arg Thr Pro Gln  
 325 330 335

Glu Phe Tyr His Asp Thr Leu Ser Phe Leu Lys Ser Asn Ala Asp Leu  
 340 345 350

Cys Tyr Gly Ala Leu Ala Ala Ile Pro Gly Leu Gln Pro Val Arg Pro  
 355 360 365

Ser Gly Ala Met Tyr Leu Met Val Gly Ile Glu Met Glu His Leu Pro  
 370 375 380

Glu Phe Glu Asn Asp Val Glu Phe Thr Glu Arg Leu Ile Ala Glu Gln  
 385 390 395 400

Ala Val His Cys Leu Pro Ala Thr Cys Phe Glu Tyr Pro Asn Phe Phe  
 405 410 415

Arg Val Val Ile Thr Val Pro Glu Val Met Met Leu Glu Ala Cys Ser  
 420 425 430

Arg Ile Gln Glu Phe Cys Glu Gln His Tyr His Cys Ala Glu Gly Ser  
 435 440 445

Gln Glu Glu Cys Asp Lys  
 450

<210> 5

<211> 1269

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1269)

<400> 5

atg gca acc ctt aag tgc att gat tgg caa ttc agc gga agc gag gcg	48
Met Ala Thr Leu Lys Cys Ile Asp Trp Gln Phe Ser Gly Ser Glu Ala	
1 5 10 15	
gcc aaa gat gct gct gcg gcc tcc tta ggc tca tat acc tct gca ctc	96
Ala Lys Asp Ala Ala Ala Ala Ser Leu Gly Ser Tyr Thr Ser Ala Leu	
20 25 30	
tat gcc ctg tgc gat cct cat ggc aaa ccc att ttg ccc cca cga aat	144
Tyr Ala Leu Cys Asp Pro His Gly Lys Pro Ile Leu Pro Pro Arg Asn	
35 40 45	
gag atc ctg gag acc agc aat aca gcc gaa aaa gca gtt gtt aaa gct	192
Glu Ile Leu Glu Thr Ser Asn Thr Ala Glu Lys Ala Val Val Lys Ala	
50 55 60	
gtt ctt tat ggc tcg gga aac gcc tat gct cct agc tta ggc ctc gcg	240
Val Leu Tyr Gly Ser Gly Asn Ala Tyr Ala Pro Ser Leu Gly Leu Ala	
65 70 75 80	
gcc gcc aaa agt gcc gta gca gag tat cta aac caa ggt ctt cca aag	288
Ala Ala Lys Ser Ala Val Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Gly Leu Pro Lys	
85 90 95	
aag ctt acc gca gat gac gtg ttt atg act ctg gga tgc aaa caa gct	336
Lys Leu Thr Ala Asp Asp Val Phe Met Thr Leu Gly Cys Lys Gln Ala	
100 105 110	
att gag ctc gcg gta gac att ctc gct aaa ccg aaa gcc aac gtt ttg	384
Ile Glu Leu Ala Val Asp Ile Leu Ala Lys Pro Lys Ala Asn Val Leu	
115 120 125	

ctt ccg agt ccc ggc ttc cca tgg gac cta gtc cgc tcc atc tac aag	432
Leu Pro Ser Pro Gly Phe Pro Trp Asp Leu Val Arg Ser Ile Tyr Lys	
130 135 140	
aac ctt gag gtc cgc cac tat aat ttc ctt cca gaa aag aac ttt gaa	480
Asn Leu Glu Val Arg His Tyr Asn Phe Leu Pro Glu Lys Asn Phe Glu	
145 150 155 160	
atc gac ttt gat agc gtc cga gcg ctc gtg gac gag aac aca ttt gcc	528
Ile Asp Phe Asp Ser Val Arg Ala Leu Val Asp Glu Asn Thr Phe Ala	
165 170 175	
ata ttt ata atc aac ccc cac aac ccc aat ggt aac acc tac tcc gag	576
Ile Phe Ile Ile Asn Pro His Asn Pro Asn Gly Asn Thr Tyr Ser Glu	
180 185 190	
gct cat ctc aaa cag ctg gct gaa ctg gct aag gaa ctc aag att atg	624
Ala His Leu Lys Gln Leu Ala Glu Leu Ala Lys Glu Leu Lys Ile Met	
195 200 205	
gtg gtt tct gac gag gtt ttt aga tgg aca ctc ttt ggt agt aac cct	672
Val Val Ser Asp Glu Val Phe Arg Trp Thr Leu Phe Gly Ser Asn Pro	
210 215 220	
ttt gtt cct atg gga aaa ttc tcg tcg atc gta cca gtg gtt aca ctc	720
Phe Val Pro Met Gly Lys Phe Ser Ser Ile Val Pro Val Val Thr Leu	
225 230 235 240	
gga tcc ata tca aag gga tgg aaa gtc cca gga tgg cga act ggt tgg	768
Gly Ser Ile Ser Lys Gly Trp Lys Val Pro Gly Trp Arg Thr Gly Trp	
245 250 255	
ctc acg cta cat gat cta gac ggt gtc ttc aga aac acc aag gtc tta	816
Leu Thr Leu His Asp Leu Asp Gly Val Phe Arg Asn Thr Lys Val Leu	
260 265 270	
caa gct gct caa gat ttt ctc cag ata aac aat aac cct ccg aca gtt	864
Gln Ala Ala Gln Asp Phe Leu Gln Ile Asn Asn Asn Pro Pro Thr Val	
275 280 285	
atc cag gcg gct att cct gac atc ttg gag aaa act cct caa gag ttt	912
Ile Gln Ala Ala Ile Pro Asp Ile Leu Glu Lys Thr Pro Gln Glu Phe	
290 295 300	
ttt gat aag agg cag agt ttt ctg aaa gat aaa gta gaa ttt ggt tat	960
Phe Asp Lys Arg Gln Ser Phe Leu Lys Asp Lys Val Glu Phe Gly Tyr	
305 310 315 320	
tct aag ctc aag tac att cct agc ctc act tgc tac atg aaa ccc gaa	1008
Ser Lys Leu Lys Tyr Ile Pro Ser Leu Thr Cys Tyr Met Lys Pro Glu	

325	330	335	
gcc tgc acc ttc tta tgg acc gag ctt gat tta tcg agc ttt gtg gac			1056
Ala Cys Thr Phe Leu Trp Thr Glu Leu Asp Leu Ser Ser Phe Val Asp			
340	345	350	
atc gaa gac gat caa gac ttt tgc aat aag ctt gct aaa gaa gaa aac			1104
Ile Glu Asp Asp Gln Asp Phe Cys Asn Lys Leu Ala Lys Glu Glu Asn			
355	360	365	
ctc gtc gtt tta cca ggg att gca ttc agt cag aag aac tgg ttg agg			1152
Leu Val Val Leu Pro Gly Ile Ala Phe Ser Gln Lys Asn Trp Leu Arg			
370	375	380	
cat tct atc gat atg gag act ccg gta ttg gag gat gca ttg gaa aga			1200
His Ser Ile Asp Met Glu Thr Pro Val Leu Glu Asp Ala Leu Glu Arg			
385	390	395	400
ttg aag agc ttc tgc gat cgc cat tcc aac aaa aaa gct ccc ctc aaa			1248
Leu Lys Ser Phe Cys Asp Arg His Ser Asn Lys Lys Ala Pro Leu Lys			
405	410	415	
gac gtc aat ggt gtt aag taa			1269
Asp Val Asn Gly Val Lys			
420			
<210> 6			
<211> 422			
<212> PRT			
<213> Arabidopsis thaliana			
<400> 6			
Met Ala Thr Leu Lys Cys Ile Asp Trp Gln Phe Ser Gly Ser Glu Ala			
1	5	10	15
Ala Lys Asp Ala Ala Ala Ala Ser Leu Gly Ser Tyr Thr Ser Ala Leu			
20	25	30	
Tyr Ala Leu Cys Asp Pro His Gly Lys Pro Ile Leu Pro Pro Arg Asn			
35	40	45	
Glu Ile Leu Glu Thr Ser Asn Thr Ala Glu Lys Ala Val Val Lys Ala			
50	55	60	
Val Leu Tyr Gly Ser Gly Asn Ala Tyr Ala Pro Ser Leu Gly Leu Ala			
65	70	75	80
Ala Ala Lys Ser Ala Val Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Gly Leu Pro Lys			
85	90	95	

Lys Leu Thr Ala Asp Asp Val Phe Met Thr Leu Gly Cys Lys Gln Ala  
 100 105 110  
 Ile Glu Leu Ala Val Asp Ile Leu Ala Lys Pro Lys Ala Asn Val Leu  
 115 120 125  
 Leu Pro Ser Pro Gly Phe Pro Trp Asp Leu Val Arg Ser Ile Tyr Lys  
 130 135 140  
 Asn Leu Glu Val Arg His Tyr Asn Phe Leu Pro Glu Lys Asn Phe Glu  
 145 150 155 160  
 Ile Asp Phe Asp Ser Val Arg Ala Leu Val Asp Glu Asn Thr Phe Ala  
 165 170 175  
 Ile Phe Ile Ile Asn Pro His Asn Pro Asn Gly Asn Thr Tyr Ser Glu  
 180 185 190  
 Ala His Leu Lys Gln Leu Ala Glu Leu Ala Lys Glu Leu Lys Ile Met  
 195 200 205  
 Val Val Ser Asp Glu Val Phe Arg Trp Thr Leu Phe Gly Ser Asn Pro  
 210 215 220  
 Phe Val Pro Met Gly Lys Phe Ser Ser Ile Val Pro Val Val Thr Leu  
 225 230 235 240  
 Gly Ser Ile Ser Lys Gly Trp Lys Val Pro Gly Trp Arg Thr Gly Trp  
 245 250 255  
 Leu Thr Leu His Asp Leu Asp Gly Val Phe Arg Asn Thr Lys Val Leu  
 260 265 270  
 Gln Ala Ala Gln Asp Phe Leu Gln Ile Asn Asn Asn Pro Pro Thr Val  
 275 280 285  
 Ile Gln Ala Ala Ile Pro Asp Ile Leu Glu Lys Thr Pro Gln Glu Phe  
 290 295 300  
 Phe Asp Lys Arg Gln Ser Phe Leu Lys Asp Lys Val Glu Phe Gly Tyr  
 305 310 315 320  
 Ser Lys Leu Lys Tyr Ile Pro Ser Leu Thr Cys Tyr Met Lys Pro Glu  
 325 330 335  
 Ala Cys Thr Phe Leu Trp Thr Glu Leu Asp Leu Ser Ser Phe Val Asp  
 340 345 350  
 Ile Glu Asp Asp Gln Asp Phe Cys Asn Lys Leu Ala Lys Glu Glu Asn

355                                      360                                      365  
 Leu Val Val Leu Pro Gly Ile Ala Phe Ser Gln Lys Asn Trp Leu Arg  
       370                                      375                                      380  
 His Ser Ile Asp Met Glu Thr Pro Val Leu Glu Asp Ala Leu Glu Arg  
 385                                      390                                      395                                      400  
 Leu Lys Ser Phe Cys Asp Arg His Ser Asn Lys Lys Ala Pro Leu Lys  
                                     405                                      410                                      415  
 Asp Val Asn Gly Val Lys  
                                     420  
  
 <210> 7  
 <211> 1334  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1332)  
  
 <400> 7  
 atg gcg agc aac gga gtt acc aac tgt aac gca aac gcc aat gtt tgg 48  
 Met Ala Ser Asn Gly Val Thr Asn Cys Asn Ala Asn Ala Asn Val Trp  
       1                                      5                                      10                                      15  
  
 cgg ttc aaa gga aac ggt gca acg agt gat gcg acg gcg gtg acg ttg 96  
 Arg Phe Lys Gly Asn Gly Ala Thr Ser Asp Ala Thr Ala Val Thr Leu  
                                     20                                      25                                      30  
  
 aga aag ctt gct ttt ggg atg ttt aaa aac tgc acc atg aac agt gga 144  
 Arg Lys Leu Ala Phe Gly Met Phe Lys Asn Cys Thr Met Asn Ser Gly  
                                     35                                      40                                      45  
  
 aag acc att ttg ttc cca act ccc ggc gag ccc tcc gcc cat tcc aac 192  
 Lys Thr Ile Leu Phe Pro Thr Pro Gly Glu Pro Ser Ala His Ser Asn  
                                     50                                      55                                      60  
  
 ttc agg act tgc ccg gaa gcc gag gaa gcc gtt gcc gac gct gca cgc 240  
 Phe Arg Thr Cys Pro Glu Ala Glu Glu Ala Val Ala Asp Ala Ala Arg  
       65                                      70                                      75                                      80  
  
 tcc ggc atg gct aac tct tac gca ccc agc cct gga gtt ttc aag gct 288  
 Ser Gly Met Ala Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Pro Gly Val Phe Lys Ala  
                                     85                                      90                                      95  
  
 aga agg gcg gtg gct gaa tat tta aac gga gaa ctt ccg acg aag ctg 336

Arg	Arg	Ala	Val	Ala	Glu	Tyr	Leu	Asn	Gly	Glu	Leu	Pro	Thr	Lys	Leu	
			100					105						110		
aag	gcc	gag	gat	gtg	tat	atc	acc	gga	gga	tgt	aac	caa	gcc	ata	gag	384
Lys	Ala	Glu	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Gly	Gly	Cys	Asn	Gln	Ala	Ile	Glu	
			115				120					125				
atc	gtg	ata	gat	tct	ctt	gcc	gga	aat	cca	tcc	acc	aac	att	cta	ctt	432
Ile	Val	Ile	Asp	Ser	Leu	Ala	Gly	Asn	Pro	Ser	Thr	Asn	Ile	Leu	Leu	
			130				135				140					
cca	agg	ccg	ggg	tat	cct	cac	tac	gat	gct	cgt	gct	gtc	tat	agc	ggc	480
Pro	Arg	Pro	Gly	Tyr	Pro	His	Tyr	Asp	Ala	Arg	Ala	Val	Tyr	Ser	Gly	
145					150				155						160	
ctc	gag	att	cgc	gaa	tac	gat	ctt	ctc	ccc	gag	agt	gat	tgg	gaa	atc	528
Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Tyr	Asp	Leu	Leu	Pro	Glu	Ser	Asp	Trp	Glu	Ile	
				165				170						175		
aat	ctc	gat	ggc	ctc	gag	gcg	gct	gcg	gat	gag	aat	acc	gtc	gca	atg	576
Asn	Leu	Asp	Gly	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Asp	Glu	Asn	Thr	Val	Ala	Met	
			180				185					190				
gta	atc	atc	aac	ccc	aac	aat	cca	tgt	gga	aac	gtc	tac	acc	tac	gac	624
Val	Ile	Ile	Asn	Pro	Asn	Asn	Pro	Cys	Gly	Asn	Val	Tyr	Thr	Tyr	Asp	
			195				200					205				
cat	ctc	aac	aag	gtc	gcg	gag	atg	gct	aga	aaa	ctc	ggt	ata	atg	ata	672
His	Leu	Asn	Lys	Val	Ala	Glu	Met	Ala	Arg	Lys	Leu	Gly	Ile	Met	Ile	
			210				215				220					
ata	tcc	gac	gaa	gta	tat	gat	cat	gtt	gta	tat	gga	gac	aag	cct	ttt	720
Ile	Ser	Asp	Glu	Val	Tyr	Asp	His	Val	Val	Tyr	Gly	Asp	Lys	Pro	Phe	
225					230				235						240	
att	ccc	atg	ggg	aag	ttt	gca	tca	ata	gct	ccg	gtg	atc	acg	ctc	gga	768
Ile	Pro	Met	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser	Ile	Ala	Pro	Val	Ile	Thr	Leu	Gly	
				245				250					255			
tcc	ata	tcc	aaa	gga	tgg	gtc	aac	cca	ggc	tgg	aga	gtt	ggc	tgg	atc	816
Ser	Ile	Ser	Lys	Gly	Trp	Val	Asn	Pro	Gly	Trp	Arg	Val	Gly	Trp	Ile	
			260				265						270			
gcc	atg	aac	gat	cct	aat	ggt	atc	ttt	gta	tct	aca	ggg	gta	gtt	caa	864
Ala	Met	Asn	Asp	Pro	Asn	Gly	Ile	Phe	Val	Ser	Thr	Gly	Val	Val	Gln	
			275				280					285				
gca	ata	gag	gat	ttt	ctt	gat	tta	act	cca	cag	cct	tca	ttt	att	ctc	912
Ala	Ile	Glu	Asp	Phe	Leu	Asp	Leu	Thr	Pro	Gln	Pro	Ser	Phe	Ile	Leu	
			290				295				300					

cag gaa gca ctt cct gat ata ttg gag aaa aca cct aaa gag ttc ttc 960  
 Gln Glu Ala Leu Pro Asp Ile Leu Glu Lys Thr Pro Lys Glu Phe Phe  
 305 310 315 320

gag aag aag atc aaa gcc atg aga cgc aac gtc gag ctt tca tgt gag 1008  
 Glu Lys Lys Ile Lys Ala Met Arg Arg Asn Val Glu Leu Ser Cys Glu  
 325 330 335

agg ctc aag gat att cct tgt ctc ttt tgt ccc aag aaa ccc gaa tct 1056  
 Arg Leu Lys Asp Ile Pro Cys Leu Phe Cys Pro Lys Lys Pro Glu Ser  
 340 345 350

tgt tct tat tta tgg ttg aag ctt gac aca tca atg ttg aat aat atc 1104  
 Cys Ser Tyr Leu Trp Leu Lys Leu Asp Thr Ser Met Leu Asn Asn Ile  
 355 360 365

aaa aat gat ttt gat ttc tgc acg aag cta gtt agt gag gag agt ctt 1152  
 Lys Asn Asp Phe Asp Phe Cys Thr Lys Leu Val Ser Glu Glu Ser Leu  
 370 375 380

atc ctt ata cca gga gtg gct cta ggg gca gag aat tgg gtg agg ata 1200  
 Ile Leu Ile Pro Gly Val Ala Leu Gly Ala Glu Asn Trp Val Arg Ile  
 385 390 395 400

tcg ata gga acc gac gaa tca gtg gta caa gaa ata ttt gac aga cta 1248  
 Ser Ile Gly Thr Asp Glu Ser Val Val Gln Glu Ile Phe Asp Arg Leu  
 405 410 415

aaa ggt ttc tat gat cgt cat gcc atc tcc aag gaa gct atc aaa ctc 1296  
 Lys Gly Phe Tyr Asp Arg His Ala Ile Ser Lys Glu Ala Ile Lys Leu  
 420 425 430

agt ggc cat gcc att aac cag atc gtc gtc tct gtc aa 1334  
 Ser Gly His Ala Ile Asn Gln Ile Val Val Ser Val  
 435 440

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 444

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 8

Met Ala Ser Asn Gly Val Thr Asn Cys Asn Ala Asn Ala Asn Val Trp  
 1 5 10 15

Arg Phe Lys Gly Asn Gly Ala Thr Ser Asp Ala Thr Ala Val Thr Leu  
 20 25 30



Arg	Lys	Leu	Ala	Phe	Gly	Met	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Met	Asn	Ser	Gly			
		35							40				45					
Lys	Thr	Ile	Leu	Phe	Pro	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ser	Ala	His	Ser	Asn			
		50					55					60						
Phe	Arg	Thr	Cys	Pro	Glu	Ala	Glu	Glu	Ala	Val	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg			
		65				70				75					80			
Ser	Gly	Met	Ala	Asn	Ser	Tyr	Ala	Pro	Ser	Pro	Gly	Val	Phe	Lys	Ala			
				85					90						95			
Arg	Arg	Ala	Val	Ala	Glu	Tyr	Leu	Asn	Gly	Glu	Leu	Pro	Thr	Lys	Leu			
			100					105					110					
Lys	Ala	Glu	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Gly	Gly	Cys	Asn	Gln	Ala	Ile	Glu			
		115					120					125						
Ile	Val	Ile	Asp	Ser	Leu	Ala	Gly	Asn	Pro	Ser	Thr	Asn	Ile	Leu	Leu			
		130				135					140							
Pro	Arg	Pro	Gly	Tyr	Pro	His	Tyr	Asp	Ala	Arg	Ala	Val	Tyr	Ser	Gly			
		145			150					155					160			
Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Tyr	Asp	Leu	Leu	Pro	Glu	Ser	Asp	Trp	Glu	Ile			
			165					170					175					
Asn	Leu	Asp	Gly	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Asp	Glu	Asn	Thr	Val	Ala	Met			
			180					185					190					
Val	Ile	Ile	Asn	Pro	Asn	Asn	Pro	Cys	Gly	Asn	Val	Tyr	Thr	Tyr	Asp			
		195				200					205							
His	Leu	Asn	Lys	Val	Ala	Glu	Met	Ala	Arg	Lys	Leu	Gly	Ile	Met	Ile			
		210				215					220							
Ile	Ser	Asp	Glu	Val	Tyr	Asp	His	Val	Val	Tyr	Gly	Asp	Lys	Pro	Phe			
		225			230					235					240			
Ile	Pro	Met	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser	Ile	Ala	Pro	Val	Ile	Thr	Leu	Gly			
			245						250					255				
Ser	Ile	Ser	Lys	Gly	Trp	Val	Asn	Pro	Gly	Trp	Arg	Val	Gly	Trp	Ile			
		260					265						270					
Ala	Met	Asn	Asp	Pro	Asn	Gly	Ile	Phe	Val	Ser	Thr	Gly	Val	Val	Gln			
		275				280						285						
Ala	Ile	Glu	Asp	Phe	Leu	Asp	Leu	Thr	Pro	Gln	Pro	Ser	Phe	Ile	Leu			
		290				295					300							

Gln Glu Ala Leu Pro Asp Ile Leu Glu Lys Thr Pro Lys Glu Phe Phe  
305 310 315 320

Glu Lys Lys Ile Lys Ala Met Arg Arg Asn Val Glu Leu Ser Cys Glu  
325 330 335

Arg Leu Lys Asp Ile Pro Cys Leu Phe Cys Pro Lys Lys Pro Glu Ser  
340 345 350

Cys Ser Tyr Leu Trp Leu Lys Leu Asp Thr Ser Met Leu Asn Asn Ile  
355 360 365

Lys Asn Asp Phe Asp Phe Cys Thr Lys Leu Val Ser Glu Glu Ser Leu  
370 375 380

Ile Leu Ile Pro Gly Val Ala Leu Gly Ala Glu Asn Trp Val Arg Ile  
385 390 395 400

Ser Ile Gly Thr Asp Glu Ser Val Val Gln Glu Ile Phe Asp Arg Leu  
405 410 415

Lys Gly Phe Tyr Asp Arg His Ala Ile Ser Lys Glu Ala Ile Lys Leu  
420 425 430

Ser Gly His Ala Ile Asn Gln Ile Val Val Ser Val  
435 440

<210> 9

<211> 1389

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1389)

<400> 9

atg agc gaa gaa caa caa cac gcc aat cta gcg gtt ccc gcg ttt aaa 48  
Met Ser Glu Glu Gln Gln His Ala Asn Leu Ala Val Pro Ala Phe Lys  
1 5 10 15

act gag aaa gat ccc gta acg caa acg caa aat ggt caa agt agc gtt 96  
Thr Glu Lys Asp Pro Val Thr Gln Thr Gln Asn Gly Gln Ser Ser Val  
20 25 30

tgg cgt ttc ggt gga agt gat aag gca gcg aaa gca tcc acc gta acg 144  
Trp Arg Phe Gly Gly Ser Asp Lys Ala Ala Lys Ala Ser Thr Val Thr  
35 40 45

ctt aga ggt gtc atc tac atg ctc ttc gac aac tgc agc aaa gac gtc	192
Leu Arg Gly Val Ile Tyr Met Leu Phe Asp Asn Cys Ser Lys Asp Val	
50 55 60	
aat aag acc att tta ccc ctc ggc cac ggt gac cct tcc gtc tac cct	240
Asn Lys Thr Ile Leu Pro Leu Gly His Gly Asp Pro Ser Val Tyr Pro	
65 70 75 80	
tgc ttc cgt acc tgt atc gaa gct gaa gac gcc gtc gtc gac gtc ctt	288
Cys Phe Arg Thr Cys Ile Glu Ala Glu Asp Ala Val Val Asp Val Leu	
85 90 95	
cgc tcc ggc aaa ggc aat tct tac ggt ccc gga gct ggg att ctc ccc	336
Arg Ser Gly Lys Gly Asn Ser Tyr Gly Pro Gly Ala Gly Ile Leu Pro	
100 105 110	
gca aga cga gcc gtt gct gat tat atg aac cga gat ctt ccg cac aag	384
Ala Arg Arg Ala Val Ala Asp Tyr Met Asn Arg Asp Leu Pro His Lys	
115 120 125	
tta acg ccc gaa gat att ttt ctg acc gct gga tgc aac caa ggg ata	432
Leu Thr Pro Glu Asp Ile Phe Leu Thr Ala Gly Cys Asn Gln Gly Ile	
130 135 140	
gag atc gtg ttc gaa tcg ttg gct cga cca aac gca aac atc ttg ctc	480
Glu Ile Val Phe Glu Ser Leu Ala Arg Pro Asn Ala Asn Ile Leu Leu	
145 150 155 160	
cca cgt cct ggc ttc cct cat tac gac gct cgt gct gct tac agt ggt	528
Pro Arg Pro Gly Phe Pro His Tyr Asp Ala Arg Ala Ala Tyr Ser Gly	
165 170 175	
ctc gag gtt cgc aag ttt gat ctt ctt ccc gag aaa gaa tgg gag att	576
Leu Glu Val Arg Lys Phe Asp Leu Leu Pro Glu Lys Glu Trp Glu Ile	
180 185 190	
gat ctt gaa ggt atc gaa gcc att gca gac gag aaa act gtg gct atg	624
Asp Leu Glu Gly Ile Glu Ala Ile Ala Asp Glu Lys Thr Val Ala Met	
195 200 205	
gtt gta att aac ccc aac aat ccc tgt gga aat gtc tac tct cac gac	672
Val Val Ile Asn Pro Asn Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Ser His Asp	
210 215 220	
cat ctc aaa aag gtt gca gag acg gct agg aag ctc ggg ata atg gtg	720
His Leu Lys Lys Val Ala Glu Thr Ala Arg Lys Leu Gly Ile Met Val	
225 230 235 240	
atc tca gac gaa gta tat gac cga act ata ttc gga gac aat cca ttt	768

Ile Ser Asp Glu Val Tyr Asp Arg Thr Ile Phe Gly Asp Asn Pro Phe	
245 250 255	
ggt cca atg ggg aag ttt gct tcg ata gtc cct gta ttg aca cta gca	816
Val Pro Met Gly Lys Phe Ala Ser Ile Val Pro Val Leu Thr Leu Ala	
260 265 270	
ggc ata tct aag gga tgg gtt gtt cct gga tgg aaa att ggc tgg att	864
Gly Ile Ser Lys Gly Trp Val Val Pro Gly Trp Lys Ile Gly Trp Ile	
275 280 285	
gcc ttg aat gat ccc gag ggc gtt ttc gag acc acc aag gtg tta caa	912
Ala Leu Asn Asp Pro Glu Gly Val Phe Glu Thr Thr Lys Val Leu Gln	
290 295 300	
tcc atc aaa cag aat ctt gac gta act cct gac cct gcc aca ata att	960
Ser Ile Lys Gln Asn Leu Asp Val Thr Pro Asp Pro Ala Thr Ile Ile	
305 310 315 320	
cag gct gca ctt cca gcg atc ctg gag aaa gcg gac aaa aac ttc ttt	1008
Gln Ala Ala Leu Pro Ala Ile Leu Glu Lys Ala Asp Lys Asn Phe Phe	
325 330 335	
gca aag aag aac aag ata ctc aaa cat aat gtt gat ttg gtg tgt gat	1056
Ala Lys Lys Asn Lys Ile Leu Lys His Asn Val Asp Leu Val Cys Asp	
340 345 350	
agg ctc aag gac atc ccc tgt gtc gtc tgt ccc aag aaa cct gag tct	1104
Arg Leu Lys Asp Ile Pro Cys Val Val Cys Pro Lys Lys Pro Glu Ser	
355 360 365	
tgc act tac tta ttg aca aag ttg gag ctg tca ctg atg gat aat atc	1152
Cys Thr Tyr Leu Leu Thr Lys Leu Glu Leu Ser Leu Met Asp Asn Ile	
370 375 380	
aag gac gat ata gat ttt tgc gta aaa ctg gcc aga gag gag aat ctc	1200
Lys Asp Asp Ile Asp Phe Cys Val Lys Leu Ala Arg Glu Glu Asn Leu	
385 390 395 400	
gtg ttt cta cca ggg gat gct ctg ggt ttg aag aac tgg acg agg ata	1248
Val Phe Leu Pro Gly Asp Ala Leu Gly Leu Lys Asn Trp Thr Arg Ile	
405 410 415	
acc atc gga gtc gaa gct cat atg ctt gag gat gca ctt gag aga ctg	1296
Thr Ile Gly Val Glu Ala His Met Leu Glu Asp Ala Leu Glu Arg Leu	
420 425 430	
aag ggt ttc tgt aca cgt cat gcc aag aag aca gag aca gaa act gag	1344
Lys Gly Phe Cys Thr Arg His Ala Lys Lys Thr Glu Thr Glu Thr Glu	
435 440 445	

tca ctt caa gct ttg aaa ctg agt gat aat aat ctc gaa atg taa 1389  
 Ser Leu Gln Ala Leu Lys Leu Ser Asp Asn Asn Leu Glu Met  
 450 455 460

<210> 10

<211> 462

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

Met Ser Glu Glu Gln Gln His Ala Asn Leu Ala Val Pro Ala Phe Lys  
 1 5 10 15

Thr Glu Lys Asp Pro Val Thr Gln Thr Gln Asn Gly Gln Ser Ser Val  
 20 25 30

Trp Arg Phe Gly Gly Ser Asp Lys Ala Ala Lys Ala Ser Thr Val Thr  
 35 40 45

Leu Arg Gly Val Ile Tyr Met Leu Phe Asp Asn Cys Ser Lys Asp Val  
 50 55 60

Asn Lys Thr Ile Leu Pro Leu Gly His Gly Asp Pro Ser Val Tyr Pro  
 65 70 75 80

Cys Phe Arg Thr Cys Ile Glu Ala Glu Asp Ala Val Val Asp Val Leu  
 85 90 95

Arg Ser Gly Lys Gly Asn Ser Tyr Gly Pro Gly Ala Gly Ile Leu Pro  
 100 105 110

Ala Arg Arg Ala Val Ala Asp Tyr Met Asn Arg Asp Leu Pro His Lys  
 115 120 125

Leu Thr Pro Glu Asp Ile Phe Leu Thr Ala Gly Cys Asn Gln Gly Ile  
 130 135 140

Glu Ile Val Phe Glu Ser Leu Ala Arg Pro Asn Ala Asn Ile Leu Leu  
 145 150 155 160

Pro Arg Pro Gly Phe Pro His Tyr Asp Ala Arg Ala Ala Tyr Ser Gly  
 165 170 175

Leu Glu Val Arg Lys Phe Asp Leu Leu Pro Glu Lys Glu Trp Glu Ile  
 180 185 190

Asp Leu Glu Gly Ile Glu Ala Ile Ala Asp Glu Lys Thr Val Ala Met  
 195 200 205

Val Val Ile Asn Pro Asn Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Ser His Asp  
 210 215 220

His Leu Lys Lys Val Ala Glu Thr Ala Arg Lys Leu Gly Ile Met Val  
 225 230 235 240

Ile Ser Asp Glu Val Tyr Asp Arg Thr Ile Phe Gly Asp Asn Pro Phe  
 245 250 255

Val Pro Met Gly Lys Phe Ala Ser Ile Val Pro Val Leu Thr Leu Ala  
 260 265 270

Gly Ile Ser Lys Gly Trp Val Val Pro Gly Trp Lys Ile Gly Trp Ile  
 275 280 285

Ala Leu Asn Asp Pro Glu Gly Val Phe Glu Thr Thr Lys Val Leu Gln  
 290 295 300

Ser Ile Lys Gln Asn Leu Asp Val Thr Pro Asp Pro Ala Thr Ile Ile  
 305 310 315 320

Gln Ala Ala Leu Pro Ala Ile Leu Glu Lys Ala Asp Lys Asn Phe Phe  
 325 330 335

Ala Lys Lys Asn Lys Ile Leu Lys His Asn Val Asp Leu Val Cys Asp  
 340 345 350

Arg Leu Lys Asp Ile Pro Cys Val Val Cys Pro Lys Lys Pro Glu Ser  
 355 360 365

Cys Thr Tyr Leu Leu Thr Lys Leu Glu Leu Ser Leu Met Asp Asn Ile  
 370 375 380

Lys Asp Asp Ile Asp Phe Cys Val Lys Leu Ala Arg Glu Glu Asn Leu  
 385 390 395 400

Val Phe Leu Pro Gly Asp Ala Leu Gly Leu Lys Asn Trp Thr Arg Ile  
 405 410 415

Thr Ile Gly Val Glu Ala His Met Leu Glu Asp Ala Leu Glu Arg Leu  
 420 425 430

Lys Gly Phe Cys Thr Arg His Ala Lys Lys Thr Glu Thr Glu Thr Glu  
 435 440 445

Ser Leu Gln Ala Leu Lys Leu Ser Asp Asn Asn Leu Glu Met  
 450 455 460

<210> 11  
 <211> 1243  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1242)

<400> 11  
 atg gag aat gga gca acg acg acg agc aca att acc atc aaa ggg att 48  
 Met Glu Asn Gly Ala Thr Thr Thr Ser Thr Ile Thr Ile Lys Gly Ile  
 1 5 10 15  
 ctg agt ttg cta atg gaa agc atc aca aca gag gaa gat gaa gga gga 96  
 Leu Ser Leu Leu Met Glu Ser Ile Thr Thr Glu Glu Asp Glu Gly Gly  
 20 25 30  
 aag aga gta ata tct ctg gga atg gga gac cca aca ctc tac tcg tgt 144  
 Lys Arg Val Ile Ser Leu Gly Met Gly Asp Pro Thr Leu Tyr Ser Cys  
 35 40 45  
 ttt cgt aca aca caa gtc tct ctt caa gct gtt tct gat tct ctt ctc 192  
 Phe Arg Thr Thr Gln Val Ser Leu Gln Ala Val Ser Asp Ser Leu Leu  
 50 55 60  
 tcc aac aag ttc cat ggt tac tct cct acc gtc ggt ctt ccc caa gct 240  
 Ser Asn Lys Phe His Gly Tyr Ser Pro Thr Val Gly Leu Pro Gln Ala  
 65 70 75 80  
 cga agg gca ata gca gag tat cta tcg cgt gat ctt cca tac aaa ctt 288  
 Arg Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Leu Ser Arg Asp Leu Pro Tyr Lys Leu  
 85 90 95  
 tca cag gat gat gtg ttt atc aca tcg ggt tgc acg caa gcg atc gat 336  
 Ser Gln Asp Asp Val Phe Ile Thr Ser Gly Cys Thr Gln Ala Ile Asp  
 100 105 110  
 gta gca ttg tcg atg tta gct cgt ccc agg gct aat ata ctt ctt cca 384  
 Val Ala Leu Ser Met Leu Ala Arg Pro Arg Ala Asn Ile Leu Leu Pro  
 115 120 125  
 agg cct ggt ttc cca atc tat gaa ctc tgt gct aag ttt aga cac ctt 432  
 Arg Pro Gly Phe Pro Ile Tyr Glu Leu Cys Ala Lys Phe Arg His Leu  
 130 135 140  
 gaa gtt cgc tac gtc gat ctt ctt ccg gaa aat gga tgg gag atc gat 480  
 Glu Val Arg Tyr Val Asp Leu Leu Pro Glu Asn Gly Trp Glu Ile Asp  
 145 150 155 160

ctt gat gct gtc gag gct ctt gca gac gaa aac acg gtt gct ttg gtt	528
Leu Asp Ala Val Glu Ala Leu Ala Asp Glu Asn Thr Val Ala Leu Val	
165 170 175	
gtt ata aac cct ggt aat cct tgc ggg aat gtc tat agc tac cag cat	576
Val Ile Asn Pro Gly Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Ser Tyr Gln His	
180 185 190	
ttg atg aag att gcg gaa tcg gcg aaa aaa cta ggg ttt ctt gtg att	624
Leu Met Lys Ile Ala Glu Ser Ala Lys Lys Leu Gly Phe Leu Val Ile	
195 200 205	
gct gat gag gtt tac ggt cat ctt gct ttt ggt agc aaa ccg ttt gtg	672
Ala Asp Glu Val Tyr Gly His Leu Ala Phe Gly Ser Lys Pro Phe Val	
210 215 220	
cca atg ggt gtg ttt gga tct att gtt cct gtg ctt act ctt ggc tct	720
Pro Met Gly Val Phe Gly Ser Ile Val Pro Val Leu Thr Leu Gly Ser	
225 230 235 240	
tta tca aag aga tgg ata gtt cca ggt tgg cga ctc ggg tgg ttt gtc	768
Leu Ser Lys Arg Trp Ile Val Pro Gly Trp Arg Leu Gly Trp Phe Val	
245 250 255	
acc act gat cct tct ggt tcc ttt aag gac cct aag atc att gag agg	816
Thr Thr Asp Pro Ser Gly Ser Phe Lys Asp Pro Lys Ile Ile Glu Arg	
260 265 270	
ttt aag aaa tac ttt gat att ctt ggt gga cca gct aca ttt att cag	864
Phe Lys Lys Tyr Phe Asp Ile Leu Gly Gly Pro Ala Thr Phe Ile Gln	
275 280 285	
gct gca gtt ccc act att ttg gaa cag acg gat gag tct ttc ttc aag	912
Ala Ala Val Pro Thr Ile Leu Glu Gln Thr Asp Glu Ser Phe Phe Lys	
290 295 300	
aaa acc ttg aac tcg ttg aag aac tct tcg gat att tgt tgt gac tgg	960
Lys Thr Leu Asn Ser Leu Lys Asn Ser Ser Asp Ile Cys Cys Asp Trp	
305 310 315 320	
atc aag gag att cct tgc att gat tcc tcg cat cga cca gaa gga tcc	1008
Ile Lys Glu Ile Pro Cys Ile Asp Ser Ser His Arg Pro Glu Gly Ser	
325 330 335	
atg gca atg atg gtc aag ctg aat ctc tca tta ctt gaa gat gta agt	1056
Met Ala Met Met Val Lys Leu Asn Leu Ser Leu Leu Glu Asp Val Ser	
340 345 350	
gac gat atc gac ttc tgt ttc aag tta gct agg gaa gaa tca gtc atc	1104
Asp Asp Ile Asp Phe Cys Phe Lys Leu Ala Arg Glu Glu Ser Val Ile	



```

      355              360              365
ctt ctt cct ggt acc gcg gtg ggg ctg aag aac tgg ctg agg ata acg    1152
Leu Leu Pro Gly Thr Ala Val Gly Leu Lys Asn Trp Leu Arg Ile Thr
      370              375              380

ttt gca gca gat gca act tcg att gaa gaa gct ttt aaa agg atc aaa    1200
Phe Ala Ala Asp Ala Thr Ser Ile Glu Glu Ala Phe Lys Arg Ile Lys
385              390              395              400

tgt ttc tat ctt aga cat gcc aag act caa tat cca acc ata t        1243
Cys Phe Tyr Leu Arg His Ala Lys Thr Gln Tyr Pro Thr Ile
      405              410

<210> 12
<211> 414
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 12
Met Glu Asn Gly Ala Thr Thr Thr Ser Thr Ile Thr Ile Lys Gly Ile
   1             5             10            15

Leu Ser Leu Leu Met Glu Ser Ile Thr Thr Glu Glu Asp Glu Gly Gly
     20           25           30

Lys Arg Val Ile Ser Leu Gly Met Gly Asp Pro Thr Leu Tyr Ser Cys
     35           40           45

Phe Arg Thr Thr Gln Val Ser Leu Gln Ala Val Ser Asp Ser Leu Leu
     50           55           60

Ser Asn Lys Phe His Gly Tyr Ser Pro Thr Val Gly Leu Pro Gln Ala
     65           70           75           80

Arg Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Leu Ser Arg Asp Leu Pro Tyr Lys Leu
     85           90           95

Ser Gln Asp Asp Val Phe Ile Thr Ser Gly Cys Thr Gln Ala Ile Asp
    100          105          110

Val Ala Leu Ser Met Leu Ala Arg Pro Arg Ala Asn Ile Leu Leu Pro
    115          120          125

Arg Pro Gly Phe Pro Ile Tyr Glu Leu Cys Ala Lys Phe Arg His Leu
    130          135          140

Glu Val Arg Tyr Val Asp Leu Leu Pro Glu Asn Gly Trp Glu Ile Asp
    145          150          155          160
```

Leu Asp Ala Val Glu Ala Leu Ala Asp Glu Asn Thr Val Ala Leu Val  
 165 170 175

Val Ile Asn Pro Gly Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Ser Tyr Gln His  
 180 185 190

Leu Met Lys Ile Ala Glu Ser Ala Lys Lys Leu Gly Phe Leu Val Ile  
 195 200 205

Ala Asp Glu Val Tyr Gly His Leu Ala Phe Gly Ser Lys Pro Phe Val  
 210 215 220

Pro Met Gly Val Phe Gly Ser Ile Val Pro Val Leu Thr Leu Gly Ser  
 225 230 235 240

Leu Ser Lys Arg Trp Ile Val Pro Gly Trp Arg Leu Gly Trp Phe Val  
 245 250 255

Thr Thr Asp Pro Ser Gly Ser Phe Lys Asp Pro Lys Ile Ile Glu Arg  
 260 265 270

Phe Lys Lys Tyr Phe Asp Ile Leu Gly Gly Pro Ala Thr Phe Ile Gln  
 275 280 285

Ala Ala Val Pro Thr Ile Leu Glu Gln Thr Asp Glu Ser Phe Phe Lys  
 290 295 300

Lys Thr Leu Asn Ser Leu Lys Asn Ser Ser Asp Ile Cys Cys Asp Trp  
 305 310 315 320

Ile Lys Glu Ile Pro Cys Ile Asp Ser Ser His Arg Pro Glu Gly Ser  
 325 330 335

Met Ala Met Met Val Lys Leu Asn Leu Ser Leu Leu Glu Asp Val Ser  
 340 345 350

Asp Asp Ile Asp Phe Cys Phe Lys Leu Ala Arg Glu Glu Ser Val Ile  
 355 360 365

Leu Leu Pro Gly Thr Ala Val Gly Leu Lys Asn Trp Leu Arg Ile Thr  
 370 375 380

Phe Ala Ala Asp Ala Thr Ser Ile Glu Glu Ala Phe Lys Arg Ile Lys  
 385 390 395 400

Cys Phe Tyr Leu Arg His Ala Lys Thr Gln Tyr Pro Thr Ile  
 405 410

<210> 13  
 <211> 1338  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1338)

<400> 13  
 atg ggc cac caa aac gcc gcc gtt tca gag aat caa aac cat gat gac 48  
 Met Gly His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn Gln Asn His Asp Asp  
 1 5 10 15  
 ggc gct gcg tcg tcg ccg gga ttc aag ctc gtc gga ttt tcc aag ttc 96  
 Gly Ala Ala Ser Ser Pro Gly Phe Lys Leu Val Gly Phe Ser Lys Phe  
 20 25 30  
 gta aga aag aat cca aag tct gat aaa ttc aag gtt aag cgc ttc cat 144  
 Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys Arg Phe His  
 35 40 45  
 cac atc gag ttc tgg tgc ggc gac gca acc aac gtc gct cgt cgc ttc 192  
 His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn Val Ala Arg Arg Phe  
 50 55 60  
 tcc tgg ggt ctg ggg atg aga ttc tcc gcc aaa tcc gat ctt tcc acc 240  
 Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu Ser Thr  
 65 70 75 80  
 gga aac atg gtt cac gcc tct tac cta ctc acc tcc ggt gac ctc cga 288  
 Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr Ser Gly Asp Leu Arg  
 85 90 95  
 ttc ctt ttc act gct cct tac tct ccg tct ctc tcc gcc gga gag att 336  
 Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Leu Ser Ala Gly Glu Ile  
 100 105 110  
 aaa ccg aca acc aca gct tct atc cca agt ttc gat cac ggc tct tgt 384  
 Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe Asp His Gly Ser Cys  
 115 120 125  
 cgt tcc ttc ttc tct tca cat ggt ctc ggt gtt aga gcc gtt gcg att 432  
 Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val Arg Ala Val Ala Ile  
 130 135 140  
 gaa gta gaa gac gca gag tca gct ttc tcc atc agt gta gct aat ggc 480  
 Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile Ser Val Ala Asn Gly  
 145 150 155 160

gct att cct tcg tcg cct cct atc gtc ctc aat gaa gca gtt acg atc	528
Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn Glu Ala Val Thr Ile	
165 170 175	
gct gag gtt aaa cta tac ggc gat gtt gtt ctc cga tat gtt agt tac	576
Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr	
180 185 190	
aaa gca gaa gat acc gaa aaa tcc gaa ttc ttg cca ggg ttc gag cgt	624
Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg	
195 200 205	
gta gag gat gcg tcg tcg ttc cca ttg gat tat ggt atc cgg cgg ctt	672
Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu	
210 215 220	
gac cac gcc gtg gga aac gtt cct gag ctt ggt ccg gct tta act tat	720
Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly Pro Ala Leu Thr Tyr	
225 230 235 240	
gta gcg ggg ttc act ggt ttt cac caa ttc gca gag ttc aca gca gac	768
Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala Glu Phe Thr Ala Asp	
245 250 255	
gac gtt gga acc gcc gag agc ggt tta aat tca gcg gtc ctg gct agc	816
Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser Ala Val Leu Ala Ser	
260 265 270	
aat gat gaa atg gtt ctt cta ccg att aac gag cca gtg cac gga aca	864
Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu Pro Val His Gly Thr	
275 280 285	
aag agg aag agt cag att cag acg tat ttg gaa cat aac gaa ggc gca	912
Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu Gly Ala	
290 295 300	
ggg cta caa cat ctg gct ctg atg agt gaa gac ata ttc agg acc ctg	960
Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp Ile Phe Arg Thr Leu	
305 310 315 320	
aga gag atg agg aag agg agc agt att gga gga ttc gac ttc atg cct	1008
Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly Phe Asp Phe Met Pro	
325 330 335	
tct cct ccg cct act tac tac cag aat ctc aag aaa cgg gtc ggc gac	1056
Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys Lys Arg Val Gly Asp	
340 345 350	
gtg ctc agc gat gat cag atc aag gag tgt gag gaa tta ggg att ctt	1104
Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly Ile Leu	

355	360	365	
gta gac aga gat gat caa ggg acg ttg ctt caa atc ttc aca aaa cca			1152
Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Thr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro			
370	375	380	
cta ggt gac agg ccg acg ata ttt ata gag ata atc cag aga gta gga			1200
Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly			
385	390	395	400
tgc atg atg aaa gat gag gaa ggg aag gct tac cag agt gga gga tgt			1248
Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr Gln Ser Gly Gly Cys			
405	410	415	
ggt ggt ttt ggc aaa ggc aat ttc tct gag ctc ttc aag tcc att gaa			1296
Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu			
420	425	430	
gaa tac gaa aag act ctt gaa gcc aaa cag tta gtg gga tga			1338
Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu Val Gly			
435	440	445	

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 445.

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 14

Met Gly His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn Gln Asn His Asp Asp
1 5 10 15

Gly Ala Ala Ser Ser Pro Gly Phe Lys Leu Val Gly Phe Ser Lys Phe
20 25 30

Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys Arg Phe His
35 40 45

His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn Val Ala Arg Arg Phe
50 55 60

Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu Ser Thr
65 70 75 80

Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr Ser Gly Asp Leu Arg
85 90 95

Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Leu Ser Ala Gly Glu Ile
100 105 110

Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe Asp His Gly Ser Cys  
 115 120 125

Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val Arg Ala Val Ala Ile  
 130 135 140

Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile Ser Val Ala Asn Gly  
 145 150 155 160

Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn Glu Ala Val Thr Ile  
 165 170 175

Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr  
 180 185 190

Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg  
 195 200 205

Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu  
 210 215 220

Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly Pro Ala Leu Thr Tyr  
 225 230 235 240

Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala Glu Phe Thr Ala Asp  
 245 250 255

Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser Ala Val Leu Ala Ser  
 260 265 270

Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu Pro Val His Gly Thr  
 275 280 285

Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu Gly Ala  
 290 295 300

Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp Ile Phe Arg Thr Leu  
 305 310 315 320

Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly Phe Asp Phe Met Pro  
 325 330 335

Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys Lys Arg Val Gly Asp  
 340 345 350

Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly Ile Leu  
 355 360 365

Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Thr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro  
 370 375 380

Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly  
 385 390 395 400  
 Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr Gln Ser Gly Gly Cys  
 405 410 415  
 Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu  
 420 425 430  
 Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu Val Gly  
 435 440 445

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 1182

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1182)

&lt;400&gt; 15

atg gag tct ctg ctc tct agt tct tct ctt gtt tcc gct gct ggt ggg 48  
 Met Glu Ser Leu Leu Ser Ser Ser Ser Leu Val Ser Ala Ala Gly Gly  
 1 5 10 15  
 ttt tgt tgg aag aag cag aat cta aag ctc cac tct tta tca gaa atc 96  
 Phe Cys Trp Lys Lys Gln Asn Leu Lys Leu His Ser Leu Ser Glu Ile  
 20 25 30  
 cga gtt ctg cgt tgt gat tcg agt aaa gtt gtc gca aaa ccg aag ttt 144  
 Arg Val Leu Arg Cys Asp Ser Ser Lys Val Val Ala Lys Pro Lys Phe  
 35 40 45  
 agg aac aat ctt gtt agg cct gat ggt caa gga tct tca ttg ttg ttg 192  
 Arg Asn Asn Leu Val Arg Pro Asp Gly Gln Gly Ser Ser Leu Leu Leu  
 50 55 60  
 tat cca aaa cat aag tcg aga ttt cgg gtt aat gcc act gcg ggt cag 240  
 Tyr Pro Lys His Lys Ser Arg Phe Arg Val Asn Ala Thr Ala Gly Gln  
 65 70 75 80  
 ccc gag gct ttc gac tcg aat agc aaa cag aag tct ttt aga gac tcg 288  
 Pro Glu Ala Phe Asp Ser Asn Ser Lys Gln Lys Ser Phe Arg Asp Ser  
 85 90 95  
 tta gat gcg ttt tac agg ttt tct agg cct cat aca gtt att ggc aca 336  
 Leu Asp Ala Phe Tyr Arg Phe Ser Arg Pro His Thr Val Ile Gly Thr

100	105	110	
gtg ctt agc att tta tct gta tct ttc tta gca gta gag aag gtt tct			384
Val Leu Ser Ile Leu Ser Val Ser Phe Leu Ala Val Glu Lys Val Ser			
115	120	125	
gat ata tct cct tta ctt ttc act ggc atc ttg gag gct gtt gtt gca			432
Asp Ile Ser Pro Leu Leu Phe Thr Gly Ile Leu Glu Ala Val Val Ala			
130	135	140	
gct ctc atg atg aac att tac ata gtt ggg cta aat cag ttg tct gat			480
Ala Leu Met Met Asn Ile Tyr Ile Val Gly Leu Asn Gln Leu Ser Asp			
145	150	155	160
ggt gaa ata gat aag gtt aac aag ccc tat ctt cca ttg gca tca gga			528
Val Glu Ile Asp Lys Val Asn Lys Pro Tyr Leu Pro Leu Ala Ser Gly			
165	170	175	
gaa tat tct gtt aac acc ggc att gca ata gta gct tcc ttc tcc atc			576
Glu Tyr Ser Val Asn Thr Gly Ile Ala Ile Val Ala Ser Phe Ser Ile			
180	185	190	
atg agt ttc tgg ctt ggg tgg att gtt ggt tca tgg cca ttg ttc tgg			624
Met Ser Phe Trp Leu Gly Trp Ile Val Gly Ser Trp Pro Leu Phe Trp			
195	200	205	
gct ctt ttt gtg agt ttc atg ctc ggt act gca tac tct atc aat ttg			672
Ala Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Ile Asn Leu			
210	215	220	
cca ctt tta cgg tgg aaa aga ttt gca ttg gtt gca gca atg tgt atc			720
Pro Leu Leu Arg Trp Lys Arg Phe Ala Leu Val Ala Ala Met Cys Ile			
225	230	235	240
ctc gct gtc cga gct att att gtt caa atc gcc ttt tat cta cat att			768
Leu Ala Val Arg Ala Ile Ile Val Gln Ile Ala Phe Tyr Leu His Ile			
245	250	255	
cag aca cat gtg ttt gga aga cca atc ttg ttc act agg cct ctt att			816
Gln Thr His Val Phe Gly Arg Pro Ile Leu Phe Thr Arg Pro Leu Ile			
260	265	270	
ttc gcc act gcg ttt atg agc ttt ttc tct gtc gtt att gca ttg ttt			864
Phe Ala Thr Ala Phe Met Ser Phe Phe Ser Val Val Ile Ala Leu Phe			
275	280	285	
aag gat ata cct gat atc gaa ggg gat aag ata ttc gga atc cga tca			912
Lys Asp Ile Pro Asp Ile Glu Gly Asp Lys Ile Phe Gly Ile Arg Ser			
290	295	300	



ttc tct gta act ctg ggt cag aaa cgg gtg ttt tgg aca tgt gtt aca 960  
 Phe Ser Val Thr Leu Gly Gln Lys Arg Val Phe Trp Thr Cys Val Thr  
 305 310 315 320

cta ctt caa atg gct tac gct gtt gca att cta gtt gga gcc aca tct 1008  
 Leu Leu Gln Met Ala Tyr Ala Val Ala Ile Leu Val Gly Ala Thr Ser  
 325 330 335

cca ttc ata tgg agc aaa gtc atc tcg gtt gtg ggt cat gtt ata ctc 1056  
 Pro Phe Ile Trp Ser Lys Val Ile Ser Val Val Gly His Val Ile Leu  
 340 345 350

gca aca act ttg tgg gct cga gct aag tcc gtt gat ctg agt agc aaa 1104  
 Ala Thr Thr Leu Trp Ala Arg Ala Lys Ser Val Asp Leu Ser Ser Lys  
 355 360 365

acc gaa ata act tca tgt tat atg ttc ata tgg aag ctc ttt tat gca 1152  
 Thr Glu Ile Thr Ser Cys Tyr Met Phe Ile Trp Lys Leu Phe Tyr Ala  
 370 375 380

gag tac ttg ctg tta cct ttt ttg aag tga 1182  
 Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Phe Leu Lys  
 385 390

<210> 16  
 <211> 393  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 16  
 Met Glu Ser Leu Leu Ser Ser Ser Ser Leu Val Ser Ala Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Phe Cys Trp Lys Lys Gln Asn Leu Lys Leu His Ser Leu Ser Glu Ile  
 20 25 30

Arg Val Leu Arg Cys Asp Ser Ser Lys Val Val Ala Lys Pro Lys Phe  
 35 40 45

Arg Asn Asn Leu Val Arg Pro Asp Gly Gln Gly Ser Ser Leu Leu Leu  
 50 55 60

Tyr Pro Lys His Lys Ser Arg Phe Arg Val Asn Ala Thr Ala Gly Gln  
 65 70 75 80

Pro Glu Ala Phe Asp Ser Asn Ser Lys Gln Lys Ser Phe Arg Asp Ser  
 85 90 95

Leu Asp Ala Phe Tyr Arg Phe Ser Arg Pro His Thr Val Ile Gly Thr

100	105	110
Val Leu Ser Ile Leu Ser Val Ser Phe Leu Ala Val Glu Lys Val Ser		
115	120	125
Asp Ile Ser Pro Leu Leu Phe Thr Gly Ile Leu Glu Ala Val Val Ala		
130	135	140
Ala Leu Met Met Asn Ile Tyr Ile Val Gly Leu Asn Gln Leu Ser Asp		
145	150	155
Val Glu Ile Asp Lys Val Asn Lys Pro Tyr Leu Pro Leu Ala Ser Gly		
	165	170
Glu Tyr Ser Val Asn Thr Gly Ile Ala Ile Val Ala Ser Phe Ser Ile		
	180	185
Met Ser Phe Trp Leu Gly Trp Ile Val Gly Ser Trp Pro Leu Phe Trp		
	195	200
Ala Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Ile Asn Leu		
	210	220
Pro Leu Leu Arg Trp Lys Arg Phe Ala Leu Val Ala Ala Met Cys Ile		
225	230	235
Leu Ala Val Arg Ala Ile Ile Val Gln Ile Ala Phe Tyr Leu His Ile		
	245	250
Gln Thr His Val Phe Gly Arg Pro Ile Leu Phe Thr Arg Pro Leu Ile		
	260	265
Phe Ala Thr Ala Phe Met Ser Phe Phe Ser Val Val Ile Ala Leu Phe		
	275	280
Lys Asp Ile Pro Asp Ile Glu Gly Asp Lys Ile Phe Gly Ile Arg Ser		
	290	300
Phe Ser Val Thr Leu Gly Gln Lys Arg Val Phe Trp Thr Cys Val Thr		
305	310	315
Leu Leu Gln Met Ala Tyr Ala Val Ala Ile Leu Val Gly Ala Thr Ser		
	325	330
Pro Phe Ile Trp Ser Lys Val Ile Ser Val Val Gly His Val Ile Leu		
	340	345
Ala Thr Thr Leu Trp Ala Arg Ala Lys Ser Val Asp Leu Ser Ser Lys		
	355	360
		365

Thr Glu Ile Thr Ser Cys Tyr Met Phe Ile Trp Lys Leu Phe Tyr Ala  
 370 375 380

Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Phe Leu Lys  
 385 390

<210> 17

<211> 1509

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1395)

<400> 17

atg gct tcc att gct ctc aaa act ttc acc ggc ctc cgt caa tcc tcg	48
Met Ala Ser Ile Ala Leu Lys Thr Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser Ser	
1 5 10 15	
ccg gaa aac aat tcc att act ctt tct aaa tcc ctc ccc ttc acc caa	96
Pro Glu Asn Asn Ser Ile Thr Leu Ser Lys Ser Leu Pro Phe Thr Gln	
20 25 30	
acc cac cgt agg ctc cga atc aat gct tcc aaa tcc agc cca aga gtc	144
Thr His Arg Arg Leu Arg Ile Asn Ala Ser Lys Ser Ser Pro Arg Val	
35 40 45	
aac ggc cgc aat ctt cgt gtt gcg gtg gtg ggc ggt ggt cct gct ggt	192
Asn Gly Arg Asn Leu Arg Val Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly	
50 55 60	
ggc gcc gcc gct gaa aca ctc gcc aag gga gga att gaa acc ttc tta	240
Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Lys Gly Gly Ile Glu Thr Phe Leu	
65 70 75 80	
atc gaa cgc aaa atg gac aac tgc aaa ccc tgc ggt ggg gcc atc cca	288
Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly Ala Ile Pro	
85 90 95	
ctt tgc atg gtg gga gaa ttt gac ctc cct ttg gat atc att gac cgg	336
Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Ile Ile Asp Arg	
100 105 110	
aaa gtt aca aag atg aag atg att tcc cca tcc aac gtt gct gtt gat	384
Lys Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Val Ala Val Asp	
115 120 125	
att ggt cag act tta aag cct cac gag tac atc ggt atg gtg cgc cgc	432

Ile	Gly	Gln	Thr	Leu	Lys	Pro	His	Glu	Tyr	Ile	Gly	Met	Val	Arg	Arg	
130						135					140					
gaa	gta	ctc	gat	gct	tac	ctc	cgt	gac	cgc	gct	gct	gaa	gcc	gga	gcc	480
Glu	Val	Leu	Asp	Ala	Tyr	Leu	Arg	Asp	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Gly	Ala	
145					150					155					160	
tct	gtt	ctc	aac	ggc	ttg	ttc	ctc	aaa	atg	gac	atg	ccc	aaa	gct	ccc	528
Ser	Val	Leu	Asn	Gly	Leu	Phe	Leu	Lys	Met	Asp	Met	Pro	Lys	Ala	Pro	
				165					170					175		
aac	gca	cct	tac	gtc	ctt	cac	tac	aca	gct	tac	gac	tcc	aaa	act	aat	576
Asn	Ala	Pro	Tyr	Val	Leu	His	Tyr	Thr	Ala	Tyr	Asp	Ser	Lys	Thr	Asn	
			180					185					190			
ggc	gcg	ggg	gag	aag	cgt	acc	ctg	gaa	gtt	gac	gcc	gtt	atc	ggc	gct	624
Gly	Ala	Gly	Glu	Lys	Arg	Thr	Leu	Glu	Val	Asp	Ala	Val	Ile	Gly	Ala	
	195					200					205					
gac	ggt	gca	aat	tcc	cgt	gtc	gca	aaa	tcc	ata	aac	gcc	ggt	gac	tac	672
Asp	Gly	Ala	Asn	Ser	Arg	Val	Ala	Lys	Ser	Ile	Asn	Ala	Gly	Asp	Tyr	
	210					215					220					
gag	tac	gct	att	gca	ttc	caa	gaa	agg	att	aaa	att	tcc	gat	gat	aaa	720
Glu	Tyr	Ala	Ile	Ala	Phe	Gln	Glu	Arg	Ile	Lys	Ile	Ser	Asp	Asp	Lys	
225					230					235					240	
atg	aag	tat	tac	gag	aat	tta	gct	gaa	atg	tac	gtg	ggt	gat	gac	gtg	768
Met	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Asn	Leu	Ala	Glu	Met	Tyr	Val	Gly	Asp	Asp	Val	
				245					250					255		
tcc	cct	gat	ttt	tac	ggg	tgg	gtt	ttc	ccc	aaa	tgt	gac	cac	gtt	gcc	816
Ser	Pro	Asp	Phe	Tyr	Gly	Trp	Val	Phe	Pro	Lys	Cys	Asp	His	Val	Ala	
			260					265					270			
gtt	ggc	act	ggc	aca	gtc	acc	cac	aaa	gct	gac	atc	aaa	aaa	ttc	cag	864
Val	Gly	Thr	Gly	Thr	Val	Thr	His	Lys	Ala	Asp	Ile	Lys	Lys	Phe	Gln	
	275						280				285					
cta	gct	aca	aga	ttg	aga	gct	gat	tcc	aaa	atc	acc	ggc	gga	aaa	att	912
Leu	Ala	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	Ile	Thr	Gly	Gly	Lys	Ile	
	290					295					300					
atc	cgg	gtc	gag	gcc	cac	ccg	att	cca	gaa	cac	cca	aga	ccc	aga	aga	960
Ile	Arg	Val	Glu	Ala	His	Pro	Ile	Pro	Glu	His	Pro	Arg	Pro	Arg	Arg	
305				310						315					320	
tta	caa	gac	aga	gtt	gca	ttg	gtt	ggt	gat	gcg	gca	ggg	tac	gtg	acc	1008
Leu	Gln	Asp	Arg	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Ala	Ala	Gly	Tyr	Val	Thr	
				325					330					335		

aaa tgt tcg ggc gaa ggg att tac ttc gcg gca aag agt gga cgt atg 1056  
 Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser Gly Arg Met  
                   340                                  345                                  350

tgt gct gaa gca att gtt gaa ggg tca gaa atg gga aaa aga atg gtg 1104  
 Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Glu Met Gly Lys Arg Met Val  
                   355                                  360                                  365

gac gag agt gat ttg agg aag tat ttg gag aaa tgg gac aag act tat 1152  
 Asp Glu Ser Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp Lys Thr Tyr  
                   370                                  375                                  380

tgg cca acg tac aag gtg ctt gat ata ttg cag aag gta ttt tac agg 1200  
 Trp Pro Thr Tyr Lys Val Leu Asp Ile Leu Gln Lys Val Phe Tyr Arg  
 385                                  390                                  395                                  400

tcg aat ccg gcg agg gaa gca ttt gtt gaa atg tgc gca gat gag tat 1248  
 Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Ala Asp Glu Tyr  
                                   405                                  410                                  415

gtg cag aag atg aca ttt gac agc tat ttg tac aag aaa gta gca cca 1296  
 Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Lys Val Ala Pro  
                                   420                                  425                                  430

gga aac cca att gaa gac ttg aag ctt gct gtg aat acc att gga agt 1344  
 Gly Asn Pro Ile Glu Asp Leu Lys Leu Ala Val Asn Thr Ile Gly Ser  
                   435                                  440                                  445

ttg gtg aga gct aat gca cta aga agg gaa atg gac aag ctc agt gta 1392  
 Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Met Asp Lys Leu Ser Val  
                   450                                  455                                  460

taa gaagattaac agcattaata ttttcttgta attgaaggat ttatttctca 1445  
 465

aattactctg taaacacctt tcatcctgcc tttaatcgga tttatgtaac ttcataattt 1505

gagc 1509

<210> 18

<211> 464

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 18

Met Ala Ser Ile Ala Leu Lys Thr Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser Ser

1

5

10

15

Pro Glu Asn Asn Ser Ile Thr Leu Ser Lys Ser Leu Pro Phe Thr Gln  
                     20                    25                    30

Thr His Arg Arg Leu Arg Ile Asn Ala Ser Lys Ser Ser Pro Arg Val  
                     35                    40                    45

Asn Gly Arg Asn Leu Arg Val Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly  
                     50                    55                    60

Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Lys Gly Gly Ile Glu Thr Phe Leu  
                     65                    70                    75                    80

Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly Ala Ile Pro  
                     85                    90                    95

Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Ile Ile Asp Arg  
                     100                    105                    110

Lys Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Val Ala Val Asp  
                     115                    120                    125

Ile Gly Gln Thr Leu Lys Pro His Glu Tyr Ile Gly Met Val Arg Arg  
                     130                    135                    140

Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Asp Arg Ala Ala Glu Ala Gly Ala  
                     145                    150                    155                    160

Ser Val Leu Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp Met Pro Lys Ala Pro  
                     165                    170                    175

Asn Ala Pro Tyr Val Leu His Tyr Thr Ala Tyr Asp Ser Lys Thr Asn  
                     180                    185                    190

Gly Ala Gly Glu Lys Arg Thr Leu Glu Val Asp Ala Val Ile Gly Ala  
                     195                    200                    205

Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asn Ala Gly Asp Tyr  
                     210                    215                    220

Glu Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Lys Ile Ser Asp Asp Lys  
                     225                    230                    235                    240

Met Lys Tyr Tyr Glu Asn Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly Asp Asp Val  
                     245                    250                    255

Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp His Val Ala  
                     260                    265                    270

Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Ala Asp Ile Lys Lys Phe Gln

275	280	285
Leu Ala Thr Arg Leu Arg Ala Asp Ser Lys Ile Thr Gly Gly Lys Ile		
290	295	300
Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg Pro Arg Arg		
305	310	315 320
Leu Gln Asp Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly Tyr Val Thr		
	325	330 335
Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser Gly Arg Met		
	340	345 350
Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Glu Met Gly Lys Arg Met Val		
	355	360 365
Asp Glu Ser Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp Lys Thr Tyr		
	370	375 380
Trp Pro Thr Tyr Lys Val Leu Asp Ile Leu Gln Lys Val Phe Tyr Arg		
385	390	395 400
Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Ala Asp Glu Tyr		
	405	410 415
Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Lys Val Ala Pro		
	420	425 430
Gly Asn Pro Ile Glu Asp Leu Lys Leu Ala Val Asn Thr Ile Gly Ser		
	435	440 445
Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Met Asp Lys Leu Ser Val		
	450	455 460

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 957

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Synechocystis PCC6803

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(957)

&lt;400&gt; 19

atg ccc gag tat ttg ctt ctg ccc gct ggc cta att tcc ctc tcc ctg	48
Met Pro Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ile Ser Leu Ser Leu	
1 5 10 15	

gcg atc gcc gct gga ctg tat ctc cta act gcc cgg ggc tat cag tca	96
Ala Ile Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln Ser	
20 25 30	
tcg gat tcc gtg gcc aac gcc tac gac caa tgg aca gag gac ggc att	144
Ser Asp Ser Val Ala Asn Ala Tyr Asp Gln Trp Thr Glu Asp Gly Ile	
35 40 45	
ttg gaa tat tac tgg ggc gac cat atc cac ctc ggc cat tat ggc gat	192
Leu Glu Tyr Tyr Trp Gly Asp His Ile His Leu Gly His Tyr Gly Asp	
50 55 60	
ccg cca gtg gcc aag gat ttc atc caa tcg aaa att gat ttt gtc cat	240
Pro Pro Val Ala Lys Asp Phe Ile Gln Ser Lys Ile Asp Phe Val His	
65 70 75 80	
gcc atg gcc cag tgg ggc gga tta gat aca ctt ccc ccc ggc aca acg	288
Ala Met Ala Gln Trp Gly Gly Leu Asp Thr Leu Pro Pro Gly Thr Thr	
85 90 95	
gta ttg gat gtg ggt tgc ggc att ggc ggt agc agt cgc att ctc gcc	336
Val Leu Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Ile Leu Ala	
100 105 110	
aaa gat tat ggt ttt aac gtt acc ggc atc acc att agt ccc caa cag	384
Lys Asp Tyr Gly Phe Asn Val Thr Gly Ile Thr Ile Ser Pro Gln Gln	
115 120 125	
gtg aaa cgg gcg acg gaa tta act cct ccc gat gtg acg gcc aag ttt	432
Val Lys Arg Ala Thr Glu Leu Thr Pro Pro Asp Val Thr Ala Lys Phe	
130 135 140	
gcg gtg gac gat gct atg gct ttg tct ttt cct gac ggt agt ttc gac	480
Ala Val Asp Asp Ala Met Ala Leu Ser Phe Pro Asp Gly Ser Phe Asp	
145 150 155 160	
gta gtt tgg tcg gtg gaa gca ggg ccc cac atg cct gac aaa gct gtg	528
Val Val Trp Ser Val Glu Ala Gly Pro His Met Pro Asp Lys Ala Val	
165 170 175	
ttt gcc aag gaa tta ctg cgg gtc gtg aaa cca ggg ggc att ctg gtg	576
Phe Ala Lys Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Pro Gly Gly Ile Leu Val	
180 185 190	
gtg gcg gat tgg aat caa cgg gac gat cgc caa gtg ccc ctc aac ttc	624
Val Ala Asp Trp Asn Gln Arg Asp Asp Arg Gln Val Pro Leu Asn Phe	
195 200 205	
tgg gaa aaa cca gtg atg cga caa ctg ttg gat caa tgg tcc cac cct	672
Trp Glu Lys Pro Val Met Arg Gln Leu Leu Asp Gln Trp Ser His Pro	



210	215	220	
gcc ttt gcc agc att gaa ggt ttt gcg gaa aat ttg gaa gcc acg ggt			720
Ala Phe Ala Ser Ile Glu Gly Phe Ala Glu Asn Leu Glu Ala Thr Gly			
225	230	235	240
ttg gtg gag ggc cag gtg act act gct gat tgg act gta ccg acc ctc			768
Leu Val Glu Gly Gln Val Thr Thr Ala Asp Trp Thr Val Pro Thr Leu			
	245	250	255
ccc gct tgg ttg gat acc att tgg cag ggc att atc cgg ccc cag ggc			816
Pro Ala Trp Leu Asp Thr Ile Trp Gln Gly Ile Ile Arg Pro Gln Gly			
	260	265	270
tgg tta caa tac ggc att cgt ggg ttt atc aaa tcc gtg cgg gaa gta			864
Trp Leu Gln Tyr Gly Ile Arg Gly Phe Ile Lys Ser Val Arg Glu Val			
	275	280	285
ccg act att tta ttg atg cgc ctt gcc ttt ggg gta gga ctt tgt cgc			912
Pro Thr Ile Leu Leu Met Arg Leu Ala Phe Gly Val Gly Leu Cys Arg			
	290	295	300
ttc ggt atg ttc aaa gca gtg cga aaa aac gcc act caa gct taa			957
Phe Gly Met Phe Lys Ala Val Arg Lys Asn Ala Thr Gln Ala			
305	310	315	
 <210> 20			
<211> 318			
<212> PRT			
<213> Synechocystis PCC6803			
 <400> 20			
Met Pro Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ile Ser Leu Ser Leu			
1	5	10	15
Ala Ile Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln Ser			
	20	25	30
Ser Asp Ser Val Ala Asn Ala Tyr Asp Gln Trp Thr Glu Asp Gly Ile			
	35	40	45
Leu Glu Tyr Tyr Trp Gly Asp His Ile His Leu Gly His Tyr Gly Asp			
	50	55	60
Pro Pro Val Ala Lys Asp Phe Ile Gln Ser Lys Ile Asp Phe Val His			
	65	70	75
Ala Met Ala Gln Trp Gly Gly Leu Asp Thr Leu Pro Pro Gly Thr Thr			
	85	90	95

Val Leu Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Ile Leu Ala  
 100 105 110  
 Lys Asp Tyr Gly Phe Asn Val Thr Gly Ile Thr Ile Ser Pro Gln Gln  
 115 120 125  
 Val Lys Arg Ala Thr Glu Leu Thr Pro Pro Asp Val Thr Ala Lys Phe  
 130 135 140  
 Ala Val Asp Asp Ala Met Ala Leu Ser Phe Pro Asp Gly Ser Phe Asp  
 145 150 155 160  
 Val Val Trp Ser Val Glu Ala Gly Pro His Met Pro Asp Lys Ala Val  
 165 170 175  
 Phe Ala Lys Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Pro Gly Gly Ile Leu Val  
 180 185 190  
 Val Ala Asp Trp Asn Gln Arg Asp Asp Arg Gln Val Pro Leu Asn Phe  
 195 200 205  
 Trp Glu Lys Pro Val Met Arg Gln Leu Leu Asp Gln Trp Ser His Pro  
 210 215 220  
 Ala Phe Ala Ser Ile Glu Gly Phe Ala Glu Asn Leu Glu Ala Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Leu Val Glu Gly Gln Val Thr Thr Ala Asp Trp Thr Val Pro Thr Leu  
 245 250 255  
 Pro Ala Trp Leu Asp Thr Ile Trp Gln Gly Ile Ile Arg Pro Gln Gly  
 260 265 270  
 Trp Leu Gln Tyr Gly Ile Arg Gly Phe Ile Lys Ser Val Arg Glu Val  
 275 280 285  
 Pro Thr Ile Leu Leu Met Arg Leu Ala Phe Gly Val Gly Leu Cys Arg  
 290 295 300  
 Phe Gly Met Phe Lys Ala Val Arg Lys Asn Ala Thr Gln Ala  
 305 310 315

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 1100

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Synechocystis PCC6803

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1092)

&lt;400&gt; 21

atg aaa ttt ccg ccc cac agt ggt tac cat tgg caa ggt caa tca cct	48
Met Lys Phe Pro Pro His Ser Gly Tyr His Trp Gln Gly Gln Ser Pro	
1 5 10 15	
ttc ttt gaa ggt tgg tac gtg cgc ctg ctt ttg ccc caa tcc ggg gaa	96
Phe Phe Glu Gly Trp Tyr Val Arg Leu Leu Leu Pro Gln Ser Gly Glu	
20 25 30	
agt ttt gct ttt atg tac tcc atc gaa aat cct gct agc gat cat cat	144
Ser Phe Ala Phe Met Tyr Ser Ile Glu Asn Pro Ala Ser Asp His His	
35 40 45	
tac ggc ggc ggt gct gtg caa att tta ggg ccg gct acg aaa aaa caa	192
Tyr Gly Gly Gly Ala Val Gln Ile Leu Gly Pro Ala Thr Lys Lys Gln	
50 55 60	
gaa aat cag gaa gac caa ctt gtt tgg cgg aca ttt ccc tcg gta aaa	240
Glu Asn Gln Glu Asp Gln Leu Val Trp Arg Thr Phe Pro Ser Val Lys	
65 70 75 80	
aaa ttt tgg gcc agt cct cgc cag ttt gcc cta ggg cat tgg gga aaa	288
Lys Phe Trp Ala Ser Pro Arg Gln Phe Ala Leu Gly His Trp Gly Lys	
85 90 95	
tgt agg gat aac agg cag gcg aaa ccc cta ctc tcc gaa gaa ttt ttt	336
Cys Arg Asp Asn Arg Gln Ala Lys Pro Leu Leu Ser Glu Glu Phe Phe	
100 105 110	
gcc acg gtc aag gaa ggt tat caa atc cat caa aat cag cac caa gga	384
Ala Thr Val Lys Glu Gly Tyr Gln Ile His Gln Asn Gln His Gln Gly	
115 120 125	
caa atc att cat ggc gat cgc cat tgt cgt tgg cag ttc acc gta gaa	432
Gln Ile Ile His Gly Asp Arg His Cys Arg Trp Gln Phe Thr Val Glu	
130 135 140	
ccg gaa gta act tgg ggg agt cct aac cga ttt cct cgg gct aca gcg	480
Pro Glu Val Thr Trp Gly Ser Pro Asn Arg Phe Pro Arg Ala Thr Ala	
145 150 155 160	
ggg tgg ctt tcc ttt tta ccc ttg ttt gat ccc ggt tgg caa att ctt	528
Gly Trp Leu Ser Phe Leu Pro Leu Phe Asp Pro Gly Trp Gln Ile Leu	
165 170 175	
tta gcc caa ggt aga gcg cac ggc tgg ctg aaa tgg cag agg gaa cag	576
Leu Ala Gln Gly Arg Ala His Gly Trp Leu Lys Trp Gln Arg Glu Gln	

180	185	190	
tat gaa ttt gac cac gcc cta gtt tat gcc gaa aaa aat tgg ggt cac			624
Tyr Glu Phe Asp His Ala Leu Val Tyr Ala Glu Lys Asn Trp Gly His			
195	200	205	
tcc ttt ccc tcc cgc tgg ttt tgg ctc caa gca aat tat ttt cct gac			672
Ser Phe Pro Ser Arg Trp Phe Trp Leu Gln Ala Asn Tyr Phe Pro Asp			
210	215	220	
cat cca gga ctg agc gtc act gcc gct ggc ggg gaa cgg att gtt ctt			720
His Pro Gly Leu Ser Val Thr Ala Ala Gly Gly Glu Arg Ile Val Leu			
225	230	235	240
ggg cgc ccc gaa gag gta gct tta att ggc tta cat cac caa ggt aat			768
Gly Arg Pro Glu Glu Val Ala Leu Ile Gly Leu His His Gln Gly Asn			
	245	250	255
ttt tac gaa ttt ggc ccg ggc cat ggc aca gtc act tgg caa gta gct			816
Phe Tyr Glu Phe Gly Pro Gly His Gly Thr Val Thr Trp Gln Val Ala			
	260	265	270
ccc tgg ggc cgt tgg caa tta aaa gcc agc aat gat agg tat tgg gtc			864
Pro Trp Gly Arg Trp Gln Leu Lys Ala Ser Asn Asp Arg Tyr Trp Val			
	275	280	285
aag ttg tcc gga aaa aca gat aaa aaa ggc agt tta gtc cac act ccc			912
Lys Leu Ser Gly Lys Thr Asp Lys Lys Gly Ser Leu Val His Thr Pro			
	290	295	300
acc gcc cag ggc tta caa ctc aac tgc cga gat acc act agg ggc tat			960
Thr Ala Gln Gly Leu Gln Leu Asn Cys Arg Asp Thr Thr Arg Gly Tyr			
305	310	315	320
ttg tat ttg caa ttg gga tct gtg ggt cac ggc ctg ata gtg caa ggg			1008
Leu Tyr Leu Gln Leu Gly Ser Val Gly His Gly Leu Ile Val Gln Gly			
	325	330	335
gaa acg gac acc gcg ggg cta gaa gtt gga ggt gat tgg ggt tta aca			1056
Glu Thr Asp Thr Ala Gly Leu Glu Val Gly Gly Asp Trp Gly Leu Thr			
	340	345	350
gag gaa aat ttg agc aaa aaa aca gtg cca ttc tga gggaataa			1100
Glu Glu Asn Leu Ser Lys Lys Thr Val Pro Phe			
	355	360	

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 363

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Synechocystis PCC6803

&lt;400&gt; 22

Met	Lys	Phe	Pro	Pro	His	Ser	Gly	Tyr	His	Trp	Gln	Gly	Gln	Ser	Pro
1				5					10					15	

Phe	Phe	Glu	Gly	Trp	Tyr	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Pro	Gln	Ser	Gly	Glu
		20						25					30		

Ser	Phe	Ala	Phe	Met	Tyr	Ser	Ile	Glu	Asn	Pro	Ala	Ser	Asp	His	His
		35					40					45			

Tyr	Gly	Gly	Gly	Ala	Val	Gln	Ile	Leu	Gly	Pro	Ala	Thr	Lys	Lys	Gln
	50					55					60				

Glu	Asn	Gln	Glu	Asp	Gln	Leu	Val	Trp	Arg	Thr	Phe	Pro	Ser	Val	Lys
65					70					75					80

Lys	Phe	Trp	Ala	Ser	Pro	Arg	Gln	Phe	Ala	Leu	Gly	His	Trp	Gly	Lys
				85					90					95	

Cys	Arg	Asp	Asn	Arg	Gln	Ala	Lys	Pro	Leu	Leu	Ser	Glu	Glu	Phe	Phe
			100					105					110		

Ala	Thr	Val	Lys	Glu	Gly	Tyr	Gln	Ile	His	Gln	Asn	Gln	His	Gln	Gly
		115					120					125			

Gln	Ile	Ile	His	Gly	Asp	Arg	His	Cys	Arg	Trp	Gln	Phe	Thr	Val	Glu
130						135					140				

Pro	Glu	Val	Thr	Trp	Gly	Ser	Pro	Asn	Arg	Phe	Pro	Arg	Ala	Thr	Ala
145					150					155					160

Gly	Trp	Leu	Ser	Phe	Leu	Pro	Leu	Phe	Asp	Pro	Gly	Trp	Gln	Ile	Leu
				165					170					175	

Leu	Ala	Gln	Gly	Arg	Ala	His	Gly	Trp	Leu	Lys	Trp	Gln	Arg	Glu	Gln
			180					185					190		

Tyr	Glu	Phe	Asp	His	Ala	Leu	Val	Tyr	Ala	Glu	Lys	Asn	Trp	Gly	His
		195					200					205			

Ser	Phe	Pro	Ser	Arg	Trp	Phe	Trp	Leu	Gln	Ala	Asn	Tyr	Phe	Pro	Asp
		210				215					220				

His	Pro	Gly	Leu	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Gly	Glu	Arg	Ile	Val	Leu
225					230					235					240

Gly	Arg	Pro	Glu	Glu	Val	Ala	Leu	Ile	Gly	Leu	His	His	Gln	Gly	Asn
				245					250					255	

Phe Tyr Glu Phe Gly Pro Gly His Gly Thr Val Thr Trp Gln Val Ala  
 260 265 270

Pro Trp Gly Arg Trp Gln Leu Lys Ala Ser Asn Asp Arg Tyr Trp Val  
 275 280 285

Lys Leu Ser Gly Lys Thr Asp Lys Lys Gly Ser Leu Val His Thr Pro  
 290 295 300

Thr Ala Gln Gly Leu Gln Leu Asn Cys Arg Asp Thr Thr Arg Gly Tyr  
 305 310 315 320

Leu Tyr Leu Gln Leu Gly Ser Val Gly His Gly Leu Ile Val Gln Gly  
 325 330 335

Glu Thr Asp Thr Ala Gly Leu Glu Val Gly Gly Asp Trp Gly Leu Thr  
 340 345 350

Glu Glu Asn Leu Ser Lys Lys Thr Val Pro Phe  
 355 360

<210> 23

<211> 1047

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1047)

<400> 23

atg aaa gca act cta gca gca ccc tct tct ctc aca agc ctc cct tat 48  
 Met Lys Ala Thr Leu Ala Ala Pro Ser Ser Leu Thr Ser Leu Pro Tyr  
 1 5 10 15

cga acc aac tct tct ttc ggc tca aag tca tcg ctt ctc ttt cgg tct 96  
 Arg Thr Asn Ser Ser Phe Gly Ser Lys Ser Ser Leu Leu Phe Arg Ser  
 20 25 30

cca tcc tcc tcc tcc tca gtc tct atg acg aca acg cgt gga aac gtg 144  
 Pro Ser Ser Ser Ser Ser Val Ser Met Thr Thr Thr Arg Gly Asn Val  
 35 40 45

gct gtg gcg gct gct gct aca tcc act gag gcg cta aga aaa gga ata 192  
 Ala Val Ala Ala Ala Ala Thr Ser Thr Glu Ala Leu Arg Lys Gly Ile  
 50 55 60

gcg gag ttc tac aat gaa act tcg ggt ttg tgg gaa gag att tgg gga 240

Ala	Glu	Phe	Tyr	Asn	Glu	Thr	Ser	Gly	Leu	Trp	Glu	Glu	Ile	Trp	Gly		
65					70				75						80		
gat	cat	atg	cat	cat	ggc	ttt	tgt	gac	cct	gat	tct	tct	gtt	caa	ctt	288	
Asp	His	Met	His	His	Gly	Phe	Cys	Asp	Pro	Asp	Ser	Ser	Val	Gln	Leu		
				85				90						95			
tct	gat	tct	ggc	cac	aag	gaa	gct	cag	atc	cgt	atg	att	gaa	gag	tct	336	
Ser	Asp	Ser	Gly	His	Lys	Glu	Ala	Gln	Ile	Arg	Met	Ile	Glu	Glu	Ser		
			100					105					110				
ctc	cgt	ttt	gcc	ggc	gtt	act	gat	gaa	gag	gag	gag	aaa	aag	ata	aag	384	
Leu	Arg	Phe	Ala	Gly	Val	Thr	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys	Lys	Ile	Lys		
		115					120					125					
aaa	gta	gtg	gat	gtt	ggg	tgt	ggg	att	gga	gga	agc	tca	aga	tat	ctt	432	
Lys	Val	Val	Asp	Val	Gly	Cys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ser	Ser	Arg	Tyr	Leu		
	130					135					140						
gcc	tct	aaa	ttt	gga	gct	gaa	tgc	att	ggc	att	act	ctc	agc	cct	gtt	480	
Ala	Ser	Lys	Phe	Gly	Ala	Glu	Cys	Ile	Gly	Ile	Thr	Leu	Ser	Pro	Val		
145					150				155						160		
cag	gcc	aag	aga	gcc	aat	gat	ctc	gcg	gct	gct	caa	tca	ctc	gct	cat	528	
Gln	Ala	Lys	Arg	Ala	Asn	Asp	Leu	Ala	Ala	Ala	Gln	Ser	Leu	Ala	His		
				165				170						175			
aag	gct	tcc	ttc	caa	gtt	gcg	gat	gcg	ttg	gat	cag	cca	ttc	gaa	gat	576	
Lys	Ala	Ser	Phe	Gln	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Asp	Gln	Pro	Phe	Glu	Asp		
			180					185					190				
gga	aaa	ttc	gat	ata	gtg	tgg	tcg	atg	gag	agt	ggc	gag	cat	atg	cct	624	
Gly	Lys	Phe	Asp	Ile	Val	Trp	Ser	Met	Glu	Ser	Gly	Glu	His	Met	Pro		
		195					200					205					
gac	aag	gcc	aag	ttt	gta	aaa	gag	ttg	gta	cgt	gtg	gcg	gct	cca	gga	672	
Asp	Lys	Ala	Lys	Phe	Val	Lys	Glu	Leu	Val	Arg	Val	Ala	Ala	Pro	Gly		
	210					215				220							
ggc	agg	ata	ata	ata	gtg	aca	tgg	tgc	cat	aga	aat	cta	tct	gcg	ggg	720	
Gly	Arg	Ile	Ile	Ile	Val	Thr	Trp	Cys	His	Arg	Asn	Leu	Ser	Ala	Gly		
225					230					235					240		
gag	gaa	gct	ttg	cag	ccg	tgg	gag	caa	aac	atc	ttg	gac	aaa	atc	cgt	768	
Glu	Glu	Ala	Leu	Gln	Pro	Trp	Glu	Gln	Asn	Ile	Leu	Asp	Lys	Ile	Arg		
				245				250						255			
aag	acg	ttc	tat	ctc	ccg	gct	tgg	tgc	tcc	acc	gat	gat	tat	gtc	aac	816	
Lys	Thr	Phe	Tyr	Leu	Pro	Ala	Trp	Cys	Ser	Thr	Asp	Asp	Tyr	Val	Asn		
			260					265					270				

ttg ctt caa tcc cat tct ctc cag gat att aag tgt gcg gat tgg tca 864  
 Leu Leu Gln Ser His Ser Leu Gln Asp Ile Lys Cys Ala Asp Trp Ser  
 275 280 285

gag aac gta gct cct ttc tgg cct gcg gtt ata cgg act gca tta aca 912  
 Glu Asn Val Ala Pro Phe Trp Pro Ala Val Ile Arg Thr Ala Leu Thr  
 290 295 300

tgg aag ggc ctt gtg tct ctg ctt cgt agt ggt atg aaa agt att aaa 960  
 Trp Lys Gly Leu Val Ser Leu Leu Arg Ser Gly Met Lys Ser Ile Lys  
 305 310 315 320

gga gca ttg aca atg cca ttg atg att gaa ggt tac aag aaa ggt gtc 1008  
 Gly Ala Leu Thr Met Pro Leu Met Ile Glu Gly Tyr Lys Lys Gly Val  
 325 330 335

att aag ttt ggt atc atc act tgc cag aag cca ctc taa 1047  
 Ile Lys Phe Gly Ile Ile Thr Cys Gln Lys Pro Leu  
 340 345

<210> 24

<211> 348

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 24

Met Lys Ala Thr Leu Ala Ala Pro Ser Ser Leu Thr Ser Leu Pro Tyr  
 1 5 10 15

Arg Thr Asn Ser Ser Phe Gly Ser Lys Ser Ser Leu Leu Phe Arg Ser  
 20 25 30

Pro Ser Ser Ser Ser Ser Val Ser Met Thr Thr Thr Arg Gly Asn Val  
 35 40 45

Ala Val Ala Ala Ala Ala Thr Ser Thr Glu Ala Leu Arg Lys Gly Ile  
 50 55 60

Ala Glu Phe Tyr Asn Glu Thr Ser Gly Leu Trp Glu Glu Ile Trp Gly  
 65 70 75 80

Asp His Met His His Gly Phe Cys Asp Pro Asp Ser Ser Val Gln Leu  
 85 90 95

Ser Asp Ser Gly His Lys Glu Ala Gln Ile Arg Met Ile Glu Glu Ser  
 100 105 110

Leu Arg Phe Ala Gly Val Thr Asp Glu Glu Glu Glu Lys Lys Ile Lys



115	120	125
Lys Val Val Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Tyr Leu		
130	135	140
Ala Ser Lys Phe Gly Ala Glu Cys Ile Gly Ile Thr Leu Ser Pro Val		
145	150	155
Gln Ala Lys Arg Ala Asn Asp Leu Ala Ala Ala Gln Ser Leu Ala His		
165	170	175
Lys Ala Ser Phe Gln Val Ala Asp Ala Leu Asp Gln Pro Phe Glu Asp		
180	185	190
Gly Lys Phe Asp Ile Val Trp Ser Met Glu Ser Gly Glu His Met Pro		
195	200	205
Asp Lys Ala Lys Phe Val Lys Glu Leu Val Arg Val Ala Ala Pro Gly		
210	215	220
Gly Arg Ile Ile Ile Val Thr Trp Cys His Arg Asn Leu Ser Ala Gly		
225	230	235
Glu Glu Ala Leu Gln Pro Trp Glu Gln Asn Ile Leu Asp Lys Ile Arg		
245	250	255
Lys Thr Phe Tyr Leu Pro Ala Trp Cys Ser Thr Asp Asp Tyr Val Asn		
260	265	270
Leu Leu Gln Ser His Ser Leu Gln Asp Ile Lys Cys Ala Asp Trp Ser		
275	280	285
Glu Asn Val Ala Pro Phe Trp Pro Ala Val Ile Arg Thr Ala Leu Thr		
290	295	300
Trp Lys Gly Leu Val Ser Leu Leu Arg Ser Gly Met Lys Ser Ile Lys		
305	310	315
Gly Ala Leu Thr Met Pro Leu Met Ile Glu Gly Tyr Lys Lys Gly Val		
325	330	335
Ile Lys Phe Gly Ile Ile Thr Cys Gln Lys Pro Leu		
340	345	

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 580

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Brassica napus

<220>

<221> misc\_structure

<222> (1)..(580)

<400> 25

gtcgacgagc tcatggggcg aagggctctg ctgcaccaag agattttctt gcaccaacgg 60  
catggtttga ggaagggcta cggcctgact acactattgt tcagaagttt ggcgggtgaac 120  
tctttactgc taaacaagat ttctctccgt tcaatgtggg tgcttggcat ggcaattacg 180  
tgccttataa gtatgacctg cacaagttct gtccatacaa cactgtcctt gtagaccatg 240  
gagatccatc tgtaaataca gttctgacag caccaacgga taaacctggg gtggccttgc 300  
ttgattttgt catattccct cctcgttggg tgggtgctga gcataccttt cgacctcctt 360  
actaccatcg taactgcatg agtgaattta tgggcctaata ctatgggtgct tacgaggcca 420  
aagctgatgg atttctacct ggtggcgcaa gtcttcacag ttgtatgaca cctcatgggc 480  
cagatacaac cacatacgag gcgacgattg ctcgtgtaaa tgcaatggct ccttataagc 540  
tcacaggcac catggccttc atgtttgagg taccagtact 580

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(30)

<400> 26

gatatcatgg actcctacgt gattcagacg 30

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(29)  
  
<400> 27  
gatatcttat ttgtcacact cctcctggc 29  
  
<210> 28  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:Primer  
  
<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(24)  
  
<400> 28  
gtcgacatgg caacccttaa gtgc 24  
  
<210> 29  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer  
  
<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(25)  
  
<400> 29  
gtcgacttac ttaacaccat tgacg 25  
  
<210> 30  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer  
  
<220>  
<221> primer\_bind

<222> (1)..(24)

<400> 30

gtcgacatgg cgagcaacgg agtt

24

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(25)

<400> 31

gtcgactcag ttgacagaga cgacg

25

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(30)

<400> 32

ggatccgatc catgagcgaa gaacaaccac

30

<210> 33

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(27)

<400> 33  
ggatccttac atttcgagat tattatc 27

<210> 34  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(27)

<400> 34  
agatctatgg agaattggagc aacgacg 27

<210> 35  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(31)

<400> 35  
agatctatat gggtggatat tgagtcttgg c 31

<210> 36  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(26)

<400> 36  
gcccgggcat ggcttccatt gctctc 26

<210> 37  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(26)

<400> 37  
gcccggggcgc tcaaattatg aagtta

26

<210> 38  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(24)

<400> 38  
ggatccatgg gccacaaaa cgcc

24

<210> 39  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(26)

<400> 39  
gtcgactcat cccactaact gtttgg

26

<210> 40  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(26)

<400> 40  
ggatccatgg agtctctgtgct ctctag

26

<210> 41  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(32)

<400> 41  
ccatggatcc tcacttcaaa aaaggtaaca gc

32

<210> 42  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(31)

<400> 42  
gatatcacca tggccgctgg actgtatctc c

31

<210> 43  
<211> 30

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(30)

<400> 43

gtcgacctta agaatttaag cttgagtggc

30

<210> 44

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(27)

<400> 44

gatatcatgg aaatttccgc cccacag

27

<210> 45

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(28)

<400> 45

gatatccagt gttattccct cagaatgg

28

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(26)

<400> 46

ggatccatga aagcaactct agcagc

26

<210> 47

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(26)

<400> 47

gtcgacttag agtggcttct ggcaag

26

<210> 48

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(24)

<400> 48

gtcgacgagc tcatgggggc gaag

24

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(21)

<400> 49

agtactggta cctcaaacat g

21

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(23)

<400> 50

tctagactag aatccaactt ctg

23

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(24)

<400> 51

tctagagctc gatcgagcgg ccgc

24

<210> 52

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(26)

<400> 52

gcccgggcca aatttacaat tgccac

26

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(23)

<400> 53

gcccgggcta attcccgatc tag

23

<210> 54

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(26)

<400> 54

gcccgggcat ctgtcgtctc aaactc

26

<210> 55

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(28)

<400> 55

gcccgggctg ttgtcgcaaa attcgccc

28

<210> 56

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(26)

<400> 56

gcccgggcat ctgtcgtctc aaactc

26

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(23)

<400> 57

gcccgggcta attcccgatc tag

23

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(25)

&lt;400&gt; 58

gcccgggcct agaatccaac ttctg

25